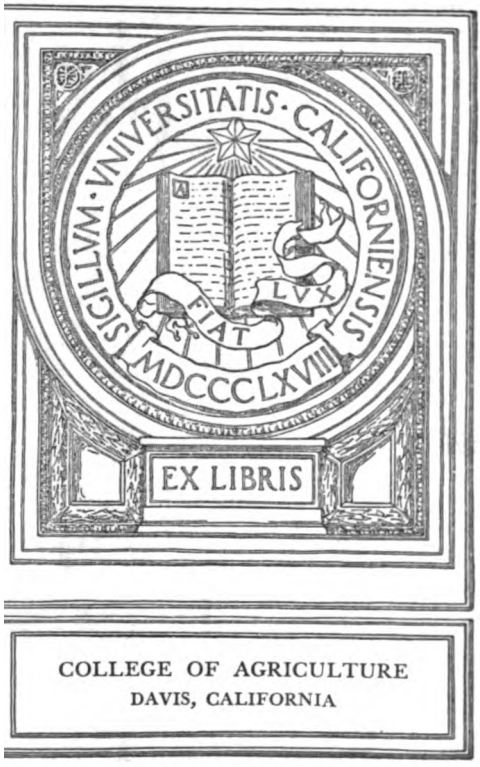


COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS, CALIFORNIA

PROF. DR. L. MICHAELIS

PROF. DR. L. MICHAELIS

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Breslau, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Chr. Bohr-Kopenhagen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Brodig-Zürich, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Fiorner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, F. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Rechmann-Breslau, F. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Dreißigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1911.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Glasberg, Alexander. Die chemischen Vorgänge bei der Kumys- und Kefirgärung. I. 1

Glasberg, Alexander. Die chemischen Vorgänge bei der Kumys- und Kefirgärung. II. 25

Lapidus, Herman. Diastase und Handelslecithin 39

Starkenstein, Emil. Die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure 56

Rona, Peter und **Dengo Takahashi.** Untersuchungen über den Blutzucker. VIII. 99

Berg, Ragnar. Über die Ausscheidung von per os eingeführten Phosphaten, besonders der Calciumphosphate 107

Michaelis, Leonor und **Heinrich Davidsohn.** Zur Theorie des isoelektrischen Punktes 143

Greffenhagen, W. Oxydation mehrwertiger Alkohole und ihrer Aldehyde bzw. Ketone durch Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung 151

Reichel, Johannes. Über das Verhalten von Penicillium gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen 152

Kepinow, L. Über den Einfluß der Blutkörperchenlipoide auf die Blutbildung 160

Battelli, F. und **L. Stern.** Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe 172

Veerheeve, N. Beiträge zum Kalkstoffwechsel. I. 195

Aron, Hans. Wachstum und Ernährung 207

Wacle, H. De und **A. J. J. Vandevelde.** Über das Schicksal von injizierten artfremden Eiweißkörpern und Peptonen 227

Kästenmacher, M. Zur Chemie der Honigbildung 237

Tahara, Y. Über das Tetrodongift 255

Hausmann, Walther. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins 276

Hasselbalch, K. A. Elektrometrische Reaktionsbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten 317

61881

Seite

Rona, P. Über das Verhalten des Chlors im Serum 332

Weiss, Moriz. Über die Vorstufen des normalen gelben Harnfarbstoffs in ihren Beziehungen zur Diazoreaktion und über eine colorimetrische Schätzung des Urochroms sowie des Urochromogens 333

Wender, Neumann. Über den Einfluß inaktiver Substanzen auf die Rotation der Lävulose 357

Galeotti, G. Versuche einer Isolierung des uricolytischen Fermentes 374

Spindler, Franz. Beiträge zur Kenntnis der Milchkatalase 384

Fürth, Otto von und **Karl Schwarz.** Über die Verteilung des Extraktivstickstoffes im Säugetiermuskel 413

Stoklasa, Julius und **Wenzel Zdobnický.** Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll 433

Völtz, Wilhelm und **August Bandrexel.** Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus 457

Scaffidi, Vittorio. Untersuchungen über den Purinstoffwechsel. V. . 473

Michaelis, Leonor und **Heinrich Davidsohn.** Trypsin und Pankreasnucleoproteid 481

Neuberg, C. Über die Erkennung von enzymatischer Nucleinsäurespaltung durch Polarisation 505

Fränkel, Siegmund. Bemerkung zur Publikation des Herrn V. Njegovan. 506

Tahara, Y. Berichtigung 506

Autorenverzeichnis 507

Die chemischen Vorgänge bei der Kumys- und Kefirgärung. I.

Untersuchungen über Steppenkumys.

Von

Alexander Ginzberg.

(Aus dem Laboratorium für pharmazeutische Chemie des medizinischen Fraueninstituts, Petersburg.)

(Eingegangen am 1. November 1910.)

Mit 3 Figuren im Text und 1 Tafel.

Einleitung.

Mit der Kumysbereitung aus Stutenmilch beschäftigen sich die östlichen Nomadenstämme Rußlands. Sie säuern die Milch ihrer Stuten mit einem speziellen Ferment oder mit altem Kumys ein.

Der Kefir ist bei den kaukasischen Bergstämmen heimisch, die ihn aus Kuhmilch mit Hilfe besonderer Kefirkörner, die in Kuh- oder Ziegenmilch gezüchtet werden, bereiten.

Die Geschichte beider Getränke ist durch ihr Alter und ihre spezifische Mythologie interessant, da die letzteren mit ihrer Abstammung und ihren Eigenschaften eng verknüpft sind. In dem Rahmen dieser Abhandlung ist es nicht möglich, auf diese Punkte näher einzugehen. Diejenigen, die sich für diese Frage speziell interessieren, finden Näheres darüber außer in der ziemlich großen Literatur in russischer Sprache, in der in deutscher Sprache verfaßten Abhandlung im Handbuch der allgemeinen Therapie von Ziemßen, ferner in der Zeitschr. f. diätet. u. physikal. Ther. 5, 302 (1901—1902), Abhandlung von Dr. Löwenson, „Kumys und seine Anwendung bei Lungentuberkulose" und in dem populären englischen Werke über Kumys von Karrik usw.

Wir wollen nur bemerken, daß schon Herodot von einem aus Stutenmilch bereiteten Getränke, das von den alten Skythen jahrhundertelang vor unserer Zeitrechnung genossen wurde, spricht. Ferner ist es bekannt, daß zur Zeit des mongolischen Joches in Rußland die Tataren,

die russischen Fürsten und die ausländischen forschungsreisenden Gäste, die zu ihnen kamen, mit Kumys bewirteten. Aber erst in den sechziger Jahren, als im Gouvernement Samara und nachher auch in den anderen Steppengouvernements die ersten Heilanstalten mit Kumysbehandlung eröffnet wurden, erwachte das wissenschaftliche Interesse für den Kumys. Gegenwärtig kommen jährlich Tausende von Kranken und Erschöpften nach den Steppen, wo sie sich vom Ende des Frühlings bis Ende des Sommers an Kumys laben.

Der bei den kaukasischen Bergbewohnern aufgefundene Kefir gelangte erst 1867 in den Besitz der Wissenschaft.

Dr. Sipovsky erstattete in der kaukasischen medizinischen Gesellschaft den ersten genauen Bericht über dieses geheimnisvolle Getränk, das die kaukasischen Bergbewohner bis dahin vor den Fremden zu verheimlichen gesucht hatten. Auf das Entstehen des Getränkes soll sich eine Sage beziehen: „die Körner, aus denen der Kefir bereitet wird, seien von dem Propheten Mohammed der Bevölkerung geschenkt worden und würden ihre zauberhafte Kraft verlieren, sobald sie in die Hände der Fremden gelangen würden."

Gegenwärtig sind beide Getränke im festen Besitze der Wissenschaft und werden eifrig von Ärzten, Biologen und Chemikern studiert.

Theoretischer Teil.

Vom wissenschaftlichen Standpunkte aus muß man in der Kumys- und Kefirfrage folgendes hervorheben.

Zur Bereitung der beiden Getränke wird Milch benutzt, ein Produkt, das einen großen Nährwert besitzt, und das schon von der Natur als Nahrungsmittel für den tierischen Organismus während der entscheidendsten Periode, wie z. B. die ersten Lebenswochen, bestimmt ist.

Dieses Nahrungsprodukt, der Kefir- oder Kumysgärung ausgesetzt, bekommt einen noch größeren Nährwert und erlangt eine noch höhere Bedeutung bei der Ernährung von durch Krankheit geschwächten Menschen, die an unregelmäßiger Verdauungstätigkeit usw. leiden, wo gleichwie im ersten jugendlichen Alter keine andere Speise vom Organismus aufgenommen werden kann.

Kefir ist gegenwärtig ziemlich gut in West-Europa bekannt und so verbreitet, daß er in allen Kurorten und Heilanstalten, wo die Frage einer regelmäßigen und verstärkten Nährung eine Rolle spielt, angewandt wird.

Kumys ist in West-Europa weniger bekannt und wird weniger gebraucht, weil es viel schwieriger ist, ihn gut und wohlschmeckend herzustellen. Auch ist die Kontrollierung seiner Zubereitung sehr schwierig. Das kommt wohl davon, daß es keine den Kefirkörnern analoge Kumys-

körner[1]) gibt, was seine Zubereitung bedeutend erschwert und sein Studium kompliziert macht.

In der vorliegenden Arbeit wird man alle Tatsachen angeführt finden, mit Hilfe derer es mir gelang, die „Kumysgärung" aufzuklären und, was noch wichtiger ist, die chemischen Normen für dieselbe festzustellen, so daß jetzt jeder Chemiker, der ein wenig Bakteriologie versteht, schon allein mit Hilfe von Titrierungen imstande sein wird, die Gärung zu verfolgen und überall einen guten Kumys zu bereiten.

Als zweite Ursache, weshalb der Kumys in West-Europa weniger verbreitet ist als der Kefir, kann wohl die Tatsache gelten, daß der Kumys in Mengen von etwa 3 bis 5 l täglich getrunken werden muß.[2])

Solch große Mengen Flüssigkeit zu sich zu nehmen, gelingt besonders durch die Verhältnisse einer russischen Steppe, d. h. in heißem und trockenem Klima, wo die Ausdünstungen des Körpers kräftig vor sich gehen und der Organismus sozusagen permanent Durst hat, jedenfalls eine große Neigung zum Trinken vorhanden ist.[3]) Außer den Steppen, die es in West-Europa nicht gibt, ist noch Stutenmilch für den Kumys erforderlich, die schwerer zu haben ist als Kuhmilch. Aber diese Hindernisse sind nicht ausschlaggebend, denn auch in West-Europa gibt es genug Ortschaften mit warmem und trockenem Klima, und wenn es noch heute schwierig ist, Stutenmilch zu bekommen, so werden doch unzweifelhaft bei Nachfrage auch Angebote hervortreten, denn Pferde hat man ja überall.

Kumys ist ein leichtflüssiges und aufbrausendes Getränk, fast nicht dicker als Milch, von angenehmem, etwas saurem Geschmack. Beim Öffnen der Flaschen, in denen er gewöhnlich reif wird, fließt er wie Champagner über, weshalb es nötig ist, sie vorsichtig aufzukorken. Oder man kann ihn durch einen speziellen Hahn, der in den Korken hineingeschraubt wird, unmittelbar in das Glas gießen. Der Kumys läßt sich leicht gläserweise trinken und wirkt angenehm erfrischend.

---

[1]) Einem der Kumysforscher in Rußland, N. Golubow (Klinische und Bakteriologische Untersuchungen über Kumys, 1890, S. 120), gelang es, die Bildung von Kumyskörnern zu beobachten, die wie Hirsekörner aussahen und nach dem Trocknen und Aufbewahren fähig waren, in Stutenmilch die Kumysgärung zu bedingen.

[2]) Diese Menge des Getränkes vermindert, wie es anfangs scheinen könnte, den Appetit nicht, sondern sie wirkt im Gegenteil auf den letzteren anregend, so daß der Kranke den Eindruck eines Vielfraßes macht.

[3]) Diese Menge von Kumys wird nicht so groß erscheinen, wenn man in Betracht zieht, wieviel Bier (3 bis 4 l) von Manchen in Deutschland und Wein mit Wasser (2 bis 4 l) in Frankreich getrunken wird.

Kefir ist eine dicke, aufbrausende Flüssigkeit und durch seine Konsistenz etwas dünnem Sauerschmante ähnlich, von sehr angenehmem Geschmack, er läßt sich aber nicht in so großer Menge wie der Kumys trinken, er ruft schnell im Magen das Gefühl der Sättigung und der Befriedigung hervor, wie es gewöhnlich nach Aufnahme von Speisen der Fall ist.

Zur Orientierung über diese drei Getränke, Milch, Kefir und Kumys, bringen wir die nachfolgende Tabelle der chemischen Zusammensetzungen der mittleren Sorten von Frauen-, Kuh- und Stutenmilch, von Kumys und Kefir.

Die einzelnen Bestandteile (auf 1000 T. des Produktes berechnet)	Frauen-	Stuten-	Kuh-	Kefir mittlerer	Kumys mittlerer
	Milch[1])				
Wasser	875,8 *838,8—914,0*	905,8 *882,4—925,3*	872,7 *803,2—903,0*	Ohne Veränderung	Ohne Veränderung
Mineralische Substanzen	3,0 *1,3—8,5*[6])	3,6 *2,2—12,0*	7,2 *5,0—14,5*	„	„
Fett	37,4 *12,7—62,0*	11,4[2]) *1,2—24,5*	36,8 *14,8—67,4*[7])	„	„
Milchzucker	63,7 *17,8—87,6*	58,7 *36,2—91,9*	49,4 *32,3—57,7*	26,7 *14,8—38,4*	23,4 *0,00—40,2*
Eiweißstoffe	20,1 *6,8—50,2*	20,5[2]) *13,3—30,0*	33,9 *18,4—57,9*	33,1 *28,3—36,0*	23,3[3]) *19,34—27,94*
Casein mit CaO und P_2O_5	8,0 *2,0—18,5*	14,6[3]) *7,0—19,1*	28,8 *19,1—46,5*	—	—
Casein fast ohne CaO und wenig P_2O_5	—	—	—	27,7 *21,7—33,4*	11,69 *6,9—14,7*
Albumin	12,1 *2,8—24,8*	5,0[3]) *2,8—14,0*	5,1 *2,3—16,1*	2,5 *0,3—4,3*	4,18 *3,2—6,0*
Acidalbumin	0	0	0	1,1 *0,9—3,0*	1,57 *0,8—3,5*
Hemialbumose	0	0	0	2,82 *1,9—4,1*	4,45 *4,2—4,9*
Pepton	0	0	0	0,46 *0,14—0,82*	1,94 *0,2—4,2*
Milchsäure	0	0	0	7,3 *5,4—9,1*	6,0[5]) *4,2—8,0*
Alkohol	0	0	0	8,8 *2,4—12,2*	14,4 *5,6—27,5*
Kohlendioxyd	0	0	0	2,2[4]) *1,8—2,9*	3,33 *0,2—6,9*

[1]) Die Zahlen für Milch sind aus Königs Werk: Chemische Zusammensetzung der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. 4. Aufl., 1903 (siehe Anmerkungen 6 und 7) entnommen. Die mittleren Zahlen für den Kefir und den Kumys sind nicht aus König entnommen, sondern

Aber bevor wir zum Vergleiche übergehen, muß bemerkt werden, daß Frauen- und Stutenmilch einerseits und Kuhmilch andererseits erheblich voneinander verschieden sind, da weder Frauen- noch Stutenmilch beim Sauerwerden einen dicken Brei bilden (Sauermilch), wie es bei der Kuhmilch der Fall ist. Casein fällt bei den zwei ersten Milcharten in Form von äußerst zarten und kleinen, auf der Zunge nicht fühlbaren Flocken aus und verändert dabei fast gar nicht die Konsistenz der Flüssigkeit. Diese Caseine besitzen nach dem Trocknen verschiedene Eigenschaften,[8]) so z. B. löst sich das Casein der Frauenmilch leicht und vollständig in Wasser auf, dasjenige der Stutenmilch etwas schwieriger, dagegen ist das Casein der Kuhmilch in

von mir berechnet aus dem Vergleiche der Analysen von meist gleichartigen Sorten des einen und des anderen Getränkes.

[2]) In allen Analysen der russischen Milchsorten sind die Zahlen höher und schwanken für Fett in den Grenzen 13,1 bis 19,0, für Eiweißstoffe 22,2 bis 31,0.

[3]) Diese Zahlen fehlen bei König und sind nach anderen Quellen, hauptsächlich nach russischen, nämlich Biel, Stange, Allik usw. zusammengestellt.

[4]) Da die Zahlen für Kohlensäuregas in den Analysen fehlen, sind sie nach der Analogie mit Kumys berechnet, für den sie gewöhnlich bestimmt wurden.

[5]) Indem ich aus den in der Literatur vorhandenen Angaben die Zahl 6,0 als Mitte in den Grenzen 4,2 bis 8,0 anführe, muß ich bemerken, daß alle diejenigen Arten Kumys, die ich i. J. 1907 bis 1908 in einigen Ortschaften des Gouvernements Ufa zu prüfen bekam, eine Säurestärke von etwa 10,0 in den Grenzen von 6,63 bis 12,1 zeigten.

[6]) In Königs zusammenfassender Tabelle von 173 Analysen (S. 110) sind für die Mineralsubstanzen die Grenzen von 0,13 bis 1,87 angegeben. Die Herkunft der Zahl 1,87 ist ganz unverständlich, denn in den Analysen ist sie nicht vorhanden, und wenn man die in drei Analysen vom Jahre 1848 vorhandenen Zahlen 1,51, 1,55 und 1,77, und die in zwei Analysen vom Jahre 1857 vorhandenen 1,33 und 1,02 außer Acht läßt, so würde der sich nur zweimal wiederholende Wert 0,85 die höchste Zahl sein.

[7]) Auch hier sind die Grenzen 1,48 bis 9,88 % angeführt, aber wenn man aus 705 Analysen (Tabellen A und B) die 8 zweifelhaften Analysen vom Jahre 1856 von Vernois und Beckerel und die 2 Analysen vom Jahre 1876 mit den Zahlen 7,40 und 7,69 außer Acht lassen würde, so bleibt als höchste Zahl der von König angeführten Analysen die Zahl 6,74, wobei man im allgemeinen nur in 7 Analysen mehr als 6 % finden kann.

[8]) Siehe Fußnote S. 6.

Wasser fast unlösbar. Ebenso lösen sich diese Caseine ungleich leicht und in derselben Reihenfolge in künstlichem Magensaft auf, d. h. leichter lösbar als die anderen ist das Casein der Frauenmilch, schwieriger dagegen das der Stutenmilch, am schwierigsten dasjenige der Kuhmilch.

Das Studium dieser Milchsorten und der Caseine[1]) zeigt, daß wir es hier mit dem gleichen Eiweißstoffe zu tun haben, der aber in den verschiedenen Sorten mit ziemlich ungleichen Mengen von Calciumoxyd und Phosphorsäureanhydrid verbunden ist, deren Zahlen z. B. für Kuh- und Stutencasein in folgenden Grenzen schwanken:

	CaO	P_2O_5
Casein der Kuhmilch	4,93	4,15
„ „ Stutenmilch . . .	1,70	1,36

Beim Vergleichen der Zusammensetzung der Frauen-, Stuten- und Kuhmilch sehen wir allgemein, daß die Stutenmilch der Zusammensetzung nach der Frauenmilch bedeutend näher steht als die Kuhmilch. So ist die Menge der Mineralsalze in der Frauen- und Stutenmilch fast gleich und zwar doppelt so klein als diejenige der Kuhmilch, ebenso ist in der Frauen- und Stutenmilch die Menge des Milchzuckers gleich, wobei beide genannte Sorten viel reicher an Milchzucker sind als die Kuhmilch. Die Menge der Eiweißstoffe ist bei ihnen quantitativ und auch qualitativ fast gleich, bei jeder einzelnen aber quantitativ kleiner als diejenige der Kuhmilch. Nur die Menge des Fettes ist in der Frauen- und Kuhmilch beinahe gleich, und zwar bedeutend größer als in der Stutenmilch.

Indem wir zu den aus der Stutenmilch und Kuhmilch zubereiteten Getränken „Kumys" und „Kefir" übergehen, muß bemerkt werden, daß die oben angeführten Tatsachen schon genügen, um dem Kumys vor dem Kefir den Vorzug zu geben, da der Kumys aus einer solchen Milch bereitet wird, die der

[1]) Langard, Vergleichende Untersuchungen über Frauen-, Kuh- und Stutenmilch. Virchows Archiv 1875. — Biel, Studien über Eiweißstoffe des Kumys und des Kefirs. Pharmaz. Zeitschr. f. Rußland 1886. Dort sind auch andere literarische Angaben zu finden. Siehe auch Handb. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere, von Carl Oppenheimer, 3, 382 bis 432, 1910. (Hier sind zahlreiche literarische Angaben über Milch angeführt.)

Frauenmilch, d. h. einem für den menschlichen Organismus natürlichen Nahrungsprodukte am nächsten steht.

Ferner sehen wir, indem wir Kefir und Kumys einerseits, mit der Milch andererseits vergleichen, daß die Kumys- und Kefirgärungen eine Reihe von Veränderungen in der Milch hervorgerufen haben, wobei parallel mit der Verminderung der Menge des Milchzuckers, Milchsäure, Alkohol und Kohlensäure ganz neu erschienen sind; ferner haben die Eiweißstoffe eine Reihe von Veränderungen erlitten, wobei das Casein fast die ganze Menge des daran gebunden gewesenen Calciumoxyds und mehr als die Hälfte des Phosphorsäureanhydrids[1]) verlor; gleichzeitig sind Casein und Albumin dem Prozesse der Peptonisierung unterworfen worden.

Wir sehen hier folglich drei parallel verlaufende Prozesse: Milchsäuregärung, Alkoholgärung und Eiweißpeptonisierung.

Mit der Entwicklung der Bakteriologie wurde natürlich das ganze Studium darauf gerichtet, die bakteriologischen Erreger der erwähnten Prozesse zu finden, um so mehr, als beim Untersuchen unter dem Mikroskop sich Kumys und Kefir als von Gärungspilzen dicht bewohnt herausstellten. Es wurde dem Studium der Flora des Kumys und des Kefirs viele Mühe und Arbeit gewidmet, und heute haben wir darüber schon eine reiche Literatur, aber bis jetzt sind die Meinungen in dieser Frage noch sehr verschieden.

Ich werde hier die bekannte Literatur nicht eingehend anführen, sondern nur auf die sich widersprechenden Resultate hinweisen, zu denen verschiedene Forscher gelangt sind. Von nun an werde ich eines klaren Überblickes wegen Kefir und Kumys besonders behandeln.

Kumys.

In der Kumysflora sind folgende Pilze aufgefunden worden:

1. Hefezellen [Saccharomyces, wahrscheinlich Torula[2])], womit alle Forscher einverstanden sind; ferner 2. das Milchsäurestäbchen Pasteur-Hüppe, kurz und biskuitförmig, (Landowski, Cochin, Biel, Gri-

[1]) Siehe Biel, l. c.

[2]) Lafar, Handb. der technischen Mykologie, 2. Aufl. 2, 125.

goriew, Stange, Schipin, Golubow); 3. ein langer Bacillus, der im Kumys vorherrschend ist, und dem man verschiedene Eigenschaften und Tätigkeiten zuschreibt; die einen schreiben ihm willkürliche Bewegungen (Sorokin, Stange, Schipin), die anderen — die Bildung von Sporen zu (Grigoriew, Stange), die dritten endlich behaupten, daß der Bacillus unbeweglich sei und keine Sporen bilde, und allgemein nur als vegetative Form des kleinen Bacillus acidi lactici Pasteur-Hüppe erscheine (Golubow); ferner schreiben manche dem Bacillus die Fähigkeit zu, Buttersäuregärung hervorzurufen (Grigoriew), andere die Fähigkeit, Eiweißstoffe zu peptonisieren (Stange, Schipin), die dritten endlich — die Fähigkeit, Milchsäuregärung hervorzurufen (Golubow, Schipin); 4. außerdem wurden noch Kokken gefunden (Grigoriew, Stange), die, wie es scheint, keinen Einfluß auf die Kumysgärung haben; 5. endlich sind in den Plattenkulturen Oidium lactis (Stange), Sarcina alba, Bacillus subtillis, Clostridium butyricum und noch andere vorgekommen, die aber als Verunreinigungen erkannt wurden.

Vom chemischen Standpunkte aus wurde die Frage nicht besser beleuchtet, trotz zahlreicher Analysen, da dieselben ungleich waren und sich auf mannigfaltige Reifestufen des Kumys bezogen.

In diesem Zustand befand sich die Angelegenheit, als dank der Freundlichkeit des Direktors der bekannten Kumysheilanstalt „Andrejew-Sanatorium", Dr. A. N. Rubel, mir die Möglichkeit gegeben wurde, in der Steppe des Gouvernements Ufa den Kumys zu untersuchen. Ich erachte es als angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Dr. Rubel meinen Dank auszudrücken.

Eigene Untersuchungen.

Bei meinem ersten Aufenthalt in der Kumysanstalt im Sommer 1907 wurde in meiner Gegenwart von einem Empiriker und Kenner des Kumysgewerbes, von dem Baschkiren Garifula, ein Versuch, der anfangs der Saison gewohnheitsmäßigen Gewinnung des Kumys aus einem besonderen Säuerungsprodukte, das in dem Gouvernement Ufa „Katyk" genannt wird, ausgeführt. „Katyk" ist eine spezielle Sauermilch, aus Kuhmilch hergestellt, mit der während des Winters frische Milch mehrmals angesäuert wird. Um aus „Katyk" Kumys zu erhalten, wird er mit Stutenmilch gemischt, wobei man täglich frische Milch zugibt und jedesmal nach sorgfältigem Umrühren bei 25° C stehen läßt, bis man eine deutliche Gasentwicklung wahrnimmt, was gewöhnlich nach 4 bis 5 Tagen eintritt. Die so erhaltene „Säuerung" wird mit der nötigen Menge Milch gemischt und nachdem man sie einige Zeit (ca. 3 Stunden) bei

22 bis 25° C hat gären lassen, in Flaschen gefüllt, die in einen kälteren Raum (15 bis 18° C) für ca. 3 Stunden gestellt und nachher in eine Temperatur von 6 bis 7° C gebracht werden.

Nach weiteren 2 bis 4 Stunden ist schon der sogenannte „schwache Kumys", nach 12 bis 18 Stunden der „mittlere" und endlich nach 35 bis 40 Stunden der „starke Kumys"[1]) entstanden.

Im ersten Jahre meines Aufenthaltes im Kumyssanatorium stand mir in der Steppe ein nur sehr primitives Laboratorium zur Verfügung. Es gelang mir aber doch, die Grundfrage ungefähr zu lösen, die dann dem weiteren Verlauf der Untersuchungen, die im nächsten Jahre zum vollen Erfolge führten, den Weg wies.

Aus Mangel an Laboratoriumsutensilien in der Steppe und wegen der Unmöglichkeit, das Nötige auch in den benachbarten größeren Städten des Steppenbezirkes zu bekommen, mußte ich mich in diesem Jahre bei der Kontrolle der Kumysgärung nur mit Titrierungen mit Alkali der gärenden Flüssigkeit und mit der Darstellung der mikroskopischen Präparate begnügen.[2])

Das eine wie das andere fand alle 3 Stunden (mit Ausnahme der Nacht) vom Momente der Inangriffnahme der Arbeit mit dem Katyk bis zur Erhaltung des fertigen Kumys statt.

Nach der Rückkehr nach Petersburg wurden die erhaltenen Resultate ausgerechnet und zusammengefaßt, die mikroskopischen Präparate mit Benzin und Chloroform entfettet, mit Fuchsin gefärbt und unter dem Mikroskop photographiert.

[1]) Außer diesen empirischen Benennungen unterscheiden die einheimischen Empiriker noch den Grad der Reife: „Junger schwacher Kumys", „Alter schwacher Kumys", „Junger mittlerer Kumys", „Alter mittlerer Kumys" usw.

Das zeigt deutlich genug, wie schwierig es ist, erfahrungsgemäß die einzelnen Stufen im unaufhörlichen Verlauf des biologischen Prozesses festzustellen, und wie nötig es ist, für die Kumysbereitung feste chemische Normen zu haben, die den Kumys nicht nach den veränderlichen Bedingungen der Temperatur, der Zeit und des Grades der Verdünnung der Säuerung mit Milch klassifizieren sollten, sondern nach der präzisen Bestimmung der Intensität des Gärungsprozesses.

[2]) Bei der Darstellung der mikroskopischen Präparate half mir tätig Frau Dr. A. A. Batschinskaja, der ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche.

Die Titrierung wurde parallel mit 3 alkalischen Lösungen durchgeführt: mit Kalilauge, Baryt- und Kalkwasser. Die beiden ersten Lösungen waren ca. $^1/_{10}$-normal, die dritte stellte eine gesättigte Lösung vor. Als Indicator diente Phenolphthalein[1]) (1%-ige verd. Alkohollösung). Die Resultate der Titrierung wurden auf Milchsäure umgerechnet.

Katyk, befreit vom Überschuß des Milchserums, hatte das Aussehen von dichtem Sauerschmante und einen angenehmen, stark saueren Geschmack. Er wurde ebenso bei einer Temperatur von 25° C stehen gelassen.

Am 24. VII. 1907, um 2 Uhr nachmittags wurden gegen 200 ccm Katyk mit einer Flasche (ca. 700 ccm) Stutenmilch sorgfältig vermischt und noch 10 Minuten in der Flasche umgeschüttelt. Die Hälfte davon wurde in der großen Flasche gelassen, die andere Hälfte in kleine Fläschchen (50 bis 60 ccm) gefüllt und alle 3 Stunden geprüft. Alles wurde bei einer Temperatur von 23 bis 25° C stehen gelassen, wobei es im Laufe von 24 Stunden noch 3 bis 4mal umgeschüttelt wurde.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurde der Inhalt der großen Flasche durch einen Marly koliert und mit einer gleichen Menge Milch vermischt, wobei er wieder 10 bis 15 Minuten sorgfältig umgeschüttelt wurde. Ein Teil davon wurde für die Prüfung in kleine Fläschchen gefüllt, der Rest blieb in der großen Flasche, wobei wieder alles bei derselben Temperatur stehen gelassen wurde.

Den weiteren Verlauf der Arbeit wird man aus folgenden Daten sehen können, in denen man den Prozentgehalt der Milchsäure angeführt findet.

24. VII.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7[2])
	2 Uhr Mitt.	5 Uhr	8 Uhr Ab.	11 Uhr.	8 Uhr Mg.	11 Uhr	2 Uhr Mitt.
KOH . .	0,592	0,728	0,872	1,024	1,264	1,384	1,572
$Ba(OH)_2$.	0,622	0,766	0,921	1,032	1,299	1,421	1,587
$Ca(OH)_2$.	0,616	0,761	0,910	1,050	1,292	1,415	1,547

[1]) Lafar, Handb. d. techn. Mykologie, 2, 2. Aufl., 1905, S. 55. Von den Vorschriften von Soxhlet und Henkel sind aus technischen Gründen folgende Abweichungen gemacht worden: Angewandt 10 ccm Milch, zugesetzt 1 cm des Indicators und mit ca. $^1/_{10}$-norm.-Alkalilösung titriert [$Ca(OH)_2$ — gesättigte Lösung].

[2]) Außer den erwähnten sind noch weitere Titrierungen um 11 Uhr abends am 25. VII (A8) und am nächsten Tage, d. h. am 26. VII (A9), um 8 Uhr morgens ausgeführt worden. Es wurden auch 2 Bestimmungen des Säuregehaltes ausgeführt, indem man die Flüssigkeit vor der Titration aufkochte, die aber zu hohe Zahlen lieferten (wahrscheinlich infolge der verstärkten Funktion der Mikroorganismen bei der Erhöhung der Temperatur):

Für Stutenmilch sind folgende Zahlen gefunden worden: Mit KOH = 0,0678, $Ba(OH)_2$ = 0,0777, $Ca(OH)_2$ = 0,0790.[1])

Für Katyk ist der Säuregehalt von 2,43% Milchsäure berechnet worden.

25. VII.	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
K . . .	0,656	0,760	0,832	0,920	1,144	1,240	1,408
Ba. . .	0,699	0,788	0,855	0,955	1,188	1,288	1,443
Ca. . .	0,680	0,786	0,850	0,952	1,173	1,171	1,428

Von B5 an wurde der Druck des Gases bemerkbar, und beim Öffnen pflegte der Korken hinausgeschleudert zu werden, aber eine Schaumbildung fand nicht statt.

26. VII., 2 Uhr nachmittags. Der Inhalt der Flasche wurde wie früher mit einer gleichen Menge Milch vermischt und nach sorgfältigem Umschütteln (10 bis 15 Minuten) wieder 24 Stunden stehen gelassen, wobei man ihn während des Stehens 2 bis 3mal umrührte.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
K . . .	0,752	0,824	0,928	1,024	1,200	1,368	1,408
Ba. . .	0,777	0,855	0,944	1,043	1,232	1,410	1,410
Ca. . .	0,765	0,842	0,948	1,037	1,216	1,369	1,407

27. VII., 2 Uhr nachmittags. Beim Öffnen der Flasche wurde der Korken heftig herausgeschleudert und die Flüssigkeit floß unter starker Schaumbildung heraus. Der Geschmack kam schon demjenigen des Kumys näher, war aber viel saurer.

Der Inhalt der Flasche wurde wie früher mit der gleichen Menge Milch vermischt, und nach dem Umschütteln wurde ein Teil für 24 Stunden stehen gelassen, der andere Teil kam in kleine Flaschen, zur Untersuchung.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
K . . .	0,664	0,744	0,824	0,944	1,144	1,232	1,264
Ba. . .	0,688	0,788	0,855	0,966	1,177	1,288	1,321
Ca. . .	0,680	0,778	0,842	0,956	1,148	1,258	1,279

	A2	A6	A8	A9
	nach dem Kochen			
KOH . . .	0,816	1,424	1,808	1,856
$Ba(OH)_2$ . .	0,844	1,465	1,954	1,943
$Ca(OH)_2$ . .			1,806	1,917

Unter anderen sind die Zahlen 1,4 und 1,8 hervorzuheben, weil Bac. ac. lact. (Pasteur-Hüppe) nicht mehr als 0,8% Milchsäure produziert (Lafar, l. c. 2, 54).

[1]) Die Zahlen wurden bei der Titrierung der Milch unmittelbar beim Melken einer Stute erhalten, wobei man auf einem empfindlichen Lackmuspapier zuerst eine schwach alkalische und etwas später eine deutlich alkalische Reaktion bekam. Die Milch zeigt aber bei der Titrierung mit alkalischer Lösung unter Verwendung von Phenolphthalein

28. VII., 2 Uhr nachmittags. Beim Öffnen der Flasche (D 7) wurde der Korken heftig hinausgesprengt, und die Flüssigkeit floß über (NB. 25° C).

Die Flüssigkeit wurde mit der gleichen Menge Milch vermischt und bei derselben Temperatur stehen gelassen.

Um 6 Uhr abends wurde sie titriert.

E 1

K = 0,656 Ba = 0,699 Ca = 0,684

Um 8 Uhr abends wurde die gleiche Menge Milch zugegeben und nach dem Umrühren bei 25° C stehen gelassen. Die Titrierung lieferte folgende Resultate:

28. VII., 8 Uhr abends F 1	29. VII., 10 Uhr morgens F 2
K . . . 0,579	1,031
Ba . . 0,544	1,099
Ca . . 0,537	1,065

29. VII., 10 Uhr morgens. Die Maische (resp. die schon reif gewordene Säuerung) wurde mit der $1^1/_2$fachen Menge Milch verdünnt und nach sorgfältigem Umrühren bei 25° C für 2 bis 4 Stunden (je nach der Energie der Schaumbildung, resp. der Intensität der alkoholischen Gärung) stehen gelassen.

Um 2 Uhr mittags war die Maische bereits ganz reif und konnte schon als „Junger Kumys" gebraucht werden; aber gewöhnlich wird sie in Flaschen getan und allmählich auf eine Temperatur bis zu 6 bis 7° C gebracht; bei dieser Temperatur bleibt sie 2 bis 4 Stunden stehen. Aus derselben Maische wird, nachdem sie längere Zeit unter 6 bis 7° C gehalten wurde, der „mittlere" oder „starke Kumys" erhalten. Auf dieselbe Weise wurden aus der Maische (G) verschiedene Sorten des Kumys in Flaschen erhalten, nachdem man ihn bei einer Temperatur von 14° C 3 Stunden gehalten hatte.

Nach 3stündigem Stehen bei 6 bis 7° C entstand der „schwache Kumys", nach 19 Stunden der „mittlere Kumys" und nach 41 Stunden der „starke Kumys".

Die Titrierung ergab folgende Resultate:

	29. VII., 2 Uhr mittags: G	29. VII., 8 Uhr abends: schwacher	30. VII., 12 Uhr mittags: mittlerer	31. VII., 10 Uhr morgens: starker
K . . .	0,624	0,696	0,778	0,841
Ba. . .	0,677	0,755	0,844	0,955
Ca . . .	0,666	0,757	0,820	0,928

Dem Geschmacke nach entsprachen alle diese drei Kumyssorten ihren Abstufungen, aber der Geschmack hatte, was höchst

einen gewissen Säuregrad. Zur Untersuchung wurde die Milch einer 6- bis 7jährigen, 10jährigen und 12jährigen Stute benutzt, wobei man als Resultat die erwähnten ganz gleichen Zahlen bekam.

Spez. Gewicht der Milch (der gesammelten) $d\frac{15}{4} = 1{,}033$.

charakteristisch ist, eine sehr angenehme Nuance, durch die sich der Kumys anfangs der Saison, im Mai, auszeichnet, weshalb er auch als bestschmeckender „Maikumys" bekannt ist. Diesen Geschmack schreibt man gewöhnlich der Wirkung zu, die das Maifutter auf die Pferde ausübt, d. h. der Zeit, in der die Wiesen viel Pfriemengras (Stipa pennata et St. Capillata) und viele andere junge Steppengräser aufweisen, die später durch die Hitze verkümmern.

Auf diese Weise hat sich nebenbei gezeigt, daß der Charakter des Futters auf den Geschmack des Kumys keinen besonderen Einfluß hat und sein Bouqet, das von der Dauer der Zubereitung des Kumys, d. h. dem Alter der Kultur der Mikroorganismen, abhängt, was höchstwahrscheinlich auf die Harmonie der Ester, die bei der Gärung nebenbei aus Alkohol und organischen Säuren entstehen, wirkt.

Aus der oben erwähnten Maische (G) kann man durch Zusatz des doppelten Volumens Milch nach 6 bis 8 Stunden neuen „jungen Kumys" erhalten. Ein Teil davon lieferte, nachdem er in Flaschen gefüllt und bei einer niedrigeren Temperatur, wie es oben beschrieben, aufbewahrt wurde, neue Flaschen Kumys. Der Rest wurde wieder mit Milch verdünnt, sorgfältig umgeschüttelt und wieder nach der Gärung bei 25° C teilweise in Flaschen gefüllt, teilweise mit Milch verdünnt. Auf dieselbe Weise wurde auch weiter im Juli und August einige Tage nacheinander ein feinschmeckender „Maikumys" erhalten. Die weitere Bereitung wurde eingestellt. Der erhaltene „mittlere Kumys" wurde am 31. VII., 4. VIII. und am 9. VIII. titriert, wobei man folgende Zahlen bekam:

	31. VII.	4. VIII.	9. VIII.
K	0,823	0,994	1,080
Ba . . .	0,888	1,066	1,121
Ca . . .	0,857	1,003	1,036

Wenn wir uns die angeführten Zahlen näher ansehen, besonders diejenigen, die am Anfang der Untersuchung ermittelt wurden, können wir genau feststellen, daß die Bestimmung der Milchsäure allein keinesfalls zum Nachweis der Regelmäßigkeit der Kumysgärung dienen kann. Am Anfang ist ihre Menge eine sehr große (in A wurde nach 33 Stunden bei der Titrierung mit KOH gefunden = 1,808, nach 44 Stunden schon

1,856% der Säure), nachher, bei der Erhöhung der Alkoholgärung, wird sie kleiner und soll für den Kumys in der Menge von 0,8 bis 0,9% als normal gelten. Diese Höhe aber hängt nicht davon ab, daß der Mikroorganismus der Milchsäuregärung nicht imstande wäre, mehr als 0,8 bis 0,9% Säure zu entwickeln (wie es z. B. bei dem Bacillus acid. lactic. Pasteur-Hüppe der Fall ist), sondern von der am Anfang konkurrierenden Wirkung der Hefezellen und später von der Wirkung der niedrigen Temperatur. Ferner zeigen diese Zahlen, daß die Titrierung mit verschiedenen alkalischen Lösungen ungleiche Resultate[1]) geben, und daß Bariumhydrat die höchsten, Kaliumhydrat die niedrigsten Daten liefert.[2])

Andere wichtige Anzeigen gab die bakterioskopische Untersuchung. Im weiteren (Tafel I, S. 38) sind die Mikrophotogramme der wichtigsten Momente des obenerwähnten Prozesses angeführt.

Wenn wir die Mikrophotogramme studieren, sehen wir, daß die Flora eines Kumys, der sorgfältig zubereitet wurde, sehr rein ist und aus zwei Arten ganz verschiedener Gärungspilze besteht: lange Stäbchen, die sich nicht selten in Kettchen dem Leptotryx ähnlich zusammenrollen, und Hefezellen, die bei der Kumysbereitung allmählich anwachsen und die zur Klasse der Saccharomyces oder noch wahrscheinlicher der Torula gehören. Andere Mikroorganismen, sogar die biskuitähnlichen Bac. acid. lact. P. H., sind nicht zu finden.

Die Bestimmung der Art des Milchsäurestäbchens und des Hefepilzes ist die Aufgabe einer speziellen bakteriologischen Untersuchung und gehört nicht hierher.[3])

---

[1]) Siehe auch Lafar, Handb. d. techn. Mykologie, S. 55. Wenn wir den Säuregehalt der Milch kennen, kann man ihn von den oben angeführten Zahlen abziehen, um Daten zu bekommen, die der Wirklichkeit näher kommen. Da aber die Zahlen für Milch (s. S. 11) die Grenzen der zweiten Dezimalstelle nicht überschreiten, so kann man sie bei technischen oder Serienbestimmungen ganz ignorieren.

[2]) Diesen Punkt diskutiere ich hier nicht, es ist aber möglich, daß ich bei weiteren Untersuchungen Gelegenheit haben werde, näher darauf einzugehen.

[3]) Diese Frage scheint in der Arbeit v. B. Rubinsky unter dem Titel „Studien über den Kumys" (Centralbl. f. Bakt. II. 28, Nr. 7/8), die im Oktober d. J. erschienen ist, gelöst zu sein.

Für die Zwecke dieser Arbeit ist die Feststellung wichtig, daß die bakterische Bevölkerung eines guten Kumys augenscheinlich nur aus zwei Erregern der fermentativen Prozesse besteht, und daß folglich Kumys nichts anderes als Stutenmilch ist, die zwei Prozessen, die im bestimmten Gleichgewichte zueinander stehen, unterworfen worden ist, nämlich der Milchsäure- und Alkoholgärung.

Mit diesen Beobachtungen und Tatsachen habe ich im nächsten Jahre, im Juli und August 1908, in demselben Kumyssanatorium in der Steppe des Gouvernements Ufa weitere Untersuchungen in Angriff genommen.

Meine erste Aufgabe war, die Frage zu klären, woher die Peptone im Kumys erscheinen, während doch in der Kumysflora der spezifische biologische Erreger der Peptonisierung sichtlich fehlt.

Für einen Chemiker könnte die Antwort leicht gegeben sein, daß die Peptonisierung der Eiweißstoffe in diesem Falle auf chemischem Wege durch die anwachsenden Mengen der Milch- und Kohlensäure und bei der lang dauernden Berührung derselben mit den Eiweißstoffen in der Flüssigkeit bewirkt wird.

Bei der experimentellen Lösung dieser Frage wurde folgendermaßen verfahren. Es wurde ein Siphon „Prana" genommen, der zur Sättigung verschiedener Getränke mit Kohlensäuregas, das sich in speziellen metallischen Patronen befand, diente. In diesen sterilisierten Siphon wurden unmittelbar aus den Zitzen einer Stute 600 ccm Milch hineingemelkt. Zur Milch wurden Alkohol und Milchsäure in dem Verhältnis, das für mittleren Kumys erforderlich ist, zugegeben (4,5 g $C_3H_6O_3$, 8,0 g C_2H_5OH), der Siphon wurde hermetisch verschlossen und in ihn Kohlensäuregas aus einer Patrone hineingepreßt (etwa 2,0 g). Dieser Siphon wurde ferner ebenso wie der Kumys gehalten, d. h. er wurde anfangs 2 bis 3 Stunden bei 15° C, nachher 16 Stunden bei 6 bis 8° C stehen gelassen. Der Inhalt des Siphons war von etwas scharfem Geschmack und erwies sich bei der bakterioskopischen Untersuchung frei von Mikroorganismen. Er wurde in einen Dialysator von der Form eines Säckchens, das aus einem sorgfältig gewaschenen Schafsblinddarm gemacht war, gebracht. Nach 24 Stunden wurde in der äußeren

Flüssigkeit nach Neutralisation mit Ätzkali und nach Zusatz von 3 bis 4 Tropfen Fehlingscher Lösung eine sehr deutliche Biuretreaktion erhalten.[1])

Auf diese Weise sehen wir, daß es zur Bildung der Peptone und der Hydrolyse der Eiweißkörper der Milch unter den Bedingungen der Kumysgärung keiner peptonisierenden Mikroorganismen bedarf.[2])

Nach dem obenerwähnten wurde es mir klar, daß man nur die Intensität der Alkoholgärung zu verfolgen hat, und daß es beim Vergleich derselben mit der Milchsäuregärung möglich ist, die chemischen Normen für die Kumysgärung, die untereinander im bestimmten Gleichgewicht stehende und parallel verlaufende Prozesse umfaßt, festzustellen.

---

[1]) Bei einer Untersuchung des mittleren Kumys unter denselben Bedingungen lieferte die äußere Flüssigkeit erst nach 24 Stunden eine schwache Biuretreaktion.

[2]) Derselbe Gedanke wurde 1890 von N. Golubow in seiner Dissertation „Klinische und bakteriologische Untersuchungen des Kumys" in ganz deutlicher Form ausgesprochen. Er stellt in dieser Arbeit auch fest, daß die mykologische Bevölkerung des Kumys nur aus zwei Mikroorganismen besteht, Bac. ac. lact. P. H. und Saccharomyces, wobei er den Typus der Hefezellen nicht festzustellen versuchte und das lange Stäbchen des Kumys als vegetative Form des Bac. ac. lact. P. H. annahm (S. 135). Das Erscheinen des Peptons bezeichnet Golubow (S. 138) „als eine neue biologische Tatsache der gemeinsamen Einwirkung zweier Kulturen von Mikroorganismen" auf Milch.

Wie aus meinen im Texte erwähnten Versuchen zu ersehen ist, ist die Bildung der Peptone nicht als eine biologische Tatsache, sondern als gewöhnliche Hydrolyse der Eiweißkörper unter Einwirkung der sich bildenden Säuren zu betrachten. Diese Tatsache ist neu und wird von mir weiteren Untersuchungen unterworfen werden. Die augenscheinliche Übereinstimmung der Beobachtungen von Golubow mit den Resultaten meines Versuches verdient betont zu werden, um so mehr, als die Dissertation von Glolubow in meine Hände erst unlängst, und zwar nach meiner Aufklärung des Prozesses der Peptonisierung, gelangte.

Was aber den Bac. ac. lac. Pasteur-Hüppe anbetrifft, so erachte ich es für nötig, ohne auf die Erörterung der bakteriologischen Bestimmung der Art des Stäbchens näher einzugehen, darauf aufmerksam zu machen, daß das Milchsäurestäbchen des Kumys imstande ist, bis zu 2% Milchsäure zu entwickeln, während in der Literatur für Bac. ac. lac. Pasteur-Hüppe behauptet wird, daß die höchste Norm 0,8% sei. Dieser chemische Widerspruch erfordert eine bakteriologische Kontrolle.

Um die Alkoholgärung zu verfolgen, mußte folgender für die Verhältnisse eines Steppenlaboratoriums passender Umweg gewählt werden, der für technische Zwecke ganz befriedigende Resultate lieferte. Wenn die Menge des Zuckers, die sich vor der Gärung in der Flüssigkeit befand, bekannt war, und wenn wir jetzt durch Titrierung z. B. mit Ätzkali die Menge der gebildeten Milchsäure resp. die Menge des für die Bildung der Milchsäure nach dem Schema:

$$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O = 4\,C_3H_6O_3$$

aufgewandten Milchzuckers bestimmen, und die Menge des in der Flüssigkeit übrig gebliebenen unveränderten Zuckers kennen, können wir mittels Subtrahieren die Menge des Zuckers, der zur Alkoholgärung verbraucht wurde, und daraus sogar auch die Menge des gebildeten Alkohols nach dem Schema[1])

$$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O = 4\,C_2H_6O + 4\,CO_2$$

berechnen.

Die Menge des Zuckers, die zur Milchsäure, und diejenige, die zu Alkohol und Kohlensäure vergoren wurde, können als Anzeiger der Intensität der beiden Prozesse dienen.

Die Bestimmung des Zuckers wurde durch Titrierung einer von allen Eiweißstoffen befreiten Flüssigkeit mit Fehlingscher Lösung ausgeführt. Das ganze Verfahren wurde nach der trefflichen Methode, die für die Analyse von Milch und Kumys von Allik[2]) vorgeschlagen wurde, ausgeführt, nämlich durch Absetzenlassen der Eiweißstoffe mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure.[3])

[1]) In der Wirklichkeit verläuft die Alkoholgärung selbstverständlich nicht nach dem oben erwähnten Schema mit der Ausbeute von 100% (Pasteur gibt die Zahl von 95% an); aber für eine annähernde Berechnung, und erst recht für eine vergleichende, kann man es gebrauchen. Man darf dabei nur nicht vergessen, daß die berechnete Menge des Alkohols höher als die wirkliche sein wird.

[2]) Allik, Chemische Analyse des Kumys, 1895, S. 15.

[3]) Bei der Bestimmung nach der erweiterten Methode von Allik ist es am bequemsten, folgendermaßen zu verfahren: Zu 50 ccm Milch oder Kumys, die sich in einem kalibrierten Kolben von 250 ccm Inhalt befinden, werden 150 ccm Wasser, nachher 10 ccm Phosphorwolframsäure (1 Teil Phosphorwolframsäure, 1 Teil starker Salzsäure und 8 Teile Wasser) zugesetzt und schließlich bis zu 250 ccm mit Wasser vorsichtig aufgefüllt. Die Fällung setzt sich schnell ab, und man erhält eine ganz klare, reine Flüssigkeit, die zum Titrieren in eine Bürette gebracht und mit der die Fehlingsche Lösung in einem Bechergläschen reduziert wird, am besten nach

Bei der Titrierung wurde angenommen, daß jedem Kubikzentimeter der Fehlingschen Lösung 0,00675% Milchzucker $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ entspricht.[1])

Ich bringe zunächst die mit normalem Kumys von täglicher Zubereitung ausgeführten Bestimmungen, wobei ich nebenstehende, von mir zusammengestellte Tabelle anführe.

In dieser Tabelle sind die experimentell erhaltenen Tatsachen und die Angaben der Bestandteile in gewöhnlichen Ziffern, die Daten der theoretischen Berechnung für die Intensitäten der Gärungsprozesse kursiv und fett gedruckt.

Die erhaltenen Tatsachen, durch Kurven dargestellt, bilden folgendes Kurvendiagramm (Fig. 1, S. 20), in dem durch ununterbrochene Linien die Bestandteile, durch punktierte die Intensitäten der Gärungsprozesse ausgedrückt sind.

Dieses Kurvendiagramm kann als Typus des Reifwerdens des Flaschenkumys (resp. nach dem letzten Zusatze von Milch zur Maische) dienen.

Die Knickpunkte und die Enden der Kurven kann man als die chemischen Normen der Kumysgärung annehmen, um so mehr als der Kumys dieses Experiments auch dem Geschmacke nach sehr geglückt war.

Zur Bestimmung der Intensität des Anwachsens der Alkoholgärung beim ganzen Prozeß wurde, wie im vorhergehenden Jahre, ein Versuch der Zubereitung des Kumys aus „Katyk" gemacht, d. h. bei fast noch gänzlichem Fehlen der Alkoholgärung.

Die experimentell erhaltenen Tatsachen sind in der Tabelle (S. 20 bis 22) niedergelegt, wobei Kursivdruck, wie auf S. 19, die Daten der theoretischen Berechnung für die Intensitäten der Gärungsprozesse angibt.

---

den Angaben von Ernst Schmidt (Pharmazeutische Chemie 2, 924, 1901). Ich will nur bemerken, daß, da man den Inhalt des Bechergläschens lange kochen muß, es für die Prüfung mit gelbem Blutlaugensalz nötig ist, diese Flüssigkeit vor dem Filtrieren bis zum früheren Volumen mit Wasser zu verdünnen und abzukühlen, da man sonst das Durchgehen der in der Flüssigkeit suspendierten Teilchen von Kupferoxydul nicht durch das Filter vermeiden kann, was nachher eine Reaktion mit dem gelben Blutlaugensalz vortäuschen kann.

Bei der Titrierung entsprechen 5,0 ccm der oben erhaltenen Zuckerlösung einem Kubikzentimeter Milch oder Kumys.

[1]) Ernst Schmidt, l. c. ibid.

12. VIII. 08.

Zu 1 Eimer „Säuerung", die vom Abend zurückgeblieben war, wurden am Morgen 2 Eimer Milch zugesetzt.

12. VIII. 1 Uhr mittags.

	Säuerung (3 Eimer)		Milch ($2^1/_2$ Eimer)
Milchsäure	0,952		0,0577
Zucker	2,26		6,25
Alkohol (ca.)	1,56 =	$\left[6{,}25 - (0{,}952 + 2{,}26)\right]\frac{184}{360}$ [1])	0

12. VIII. $2^1/_2$ Uhr mittags.

	Für die erhaltene Maische berechnet	Junger Kumys	
		Intensität d. Milchsäuregärung	
Milchsäure	0,500 [2])	$0{,}632 - 0{,}500 = \mathbf{0{,}132}$	
		Intensität der Alkoholgärung	
Zucker	4,26	$4{,}26 - 3{,}34 = 0{,}92;\ 0{,}92 - 0{,}132 = \mathbf{0{,}788};\ 0{,}788\,\frac{184}{360} = 0{,}403$	
Alkohol	0,853		0,853
			1,256

13. VIII. 12 Uhr mittags.

	Mittlerer Kumys	
Milchsäure	$0{,}877 - 0{,}500 = \mathbf{0{,}377}$	
Zucker	$4{,}26 - 2{,}25 = 2{,}01;\ 2{,}01 - 0{,}377 = \mathbf{1{,}633};\ 1{,}633\,\frac{184}{360} = 0{,}833$	
Alkohol		0,853
		1,686

14. VIII. 11 Uhr morgens.

	Starker Kumys	
Milchsäure	$0{,}976 - 0{,}500 = \mathbf{0{,}476}$	
Zucker	$4{,}26 - 2{,}12 = 2{,}14;\ 2{,}14 - 0{,}476 = \mathbf{1{,}664};\ 1{,}664\,\frac{184}{360} = 0{,}850$	
Alkohol		0,853
		1,703

[1]) 6,25 ist der wahrscheinliche Zuckergehalt der Milch, aus der die Säuerung hergestellt wurde.

$\frac{184}{360}$ entspricht $(C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O = 4\,C_2H_6O + 4\,CO_2)$
360 184

[2]) Die mittlere Zahl ist eigentlich 0,545, aber, wie aus den oben angeführten Zahlen und hauptsächlich aus den folgenden Tatsachen zu ersehen ist, erhält man fast immer beim Vermischen der Säuerung mit Milch die Säure bei dem sofortigen Bestimmen auf 5—15% niedriger als die mittlere arithmetische Zahl.

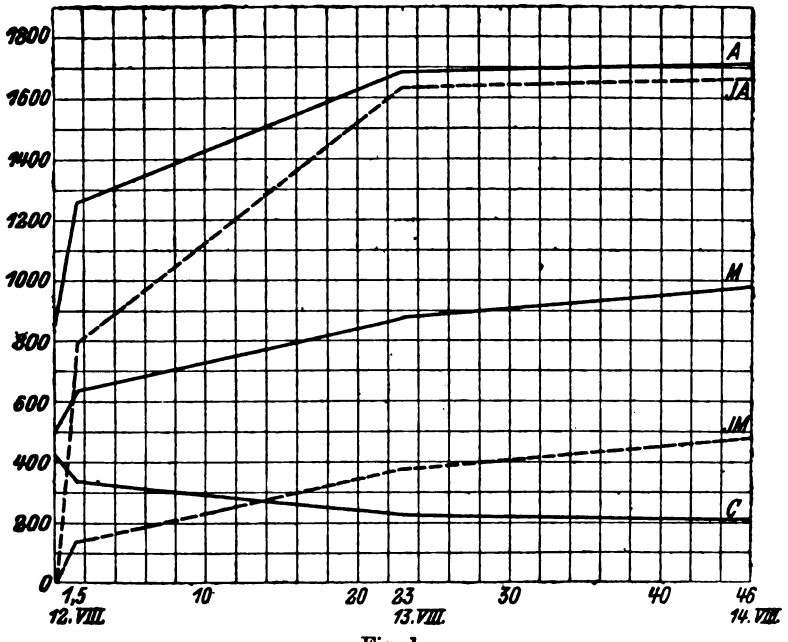


Fig. 1.

Das Diagramm des normalen Kumys (von 1 Uhr mittags 12. VIII bis 11 Uhr morgens 14. VIII. 1908).

Die Ordinate zeigt die Mengen des Alkohols und der Milchsäure in Milligrammen und des Zuckers in Zentigrammen, die Abszisse — die Dauer der Gärung in Stunden.

A Die Menge des Alkohols, *M* — der Milchsäure, *C* — des Zuckers, *JA* die Intensität der Alkoholgärung in Milligrammen des vergorenen Zuckers ausgedrückt, *JM* die Insensität der Milchsäuregärung in Milligrammen des Zuckers.

Der Anfang der Kurven zeigt die Bestandteile der Maische, die Knicke und Enden der Kurven entsprechen stufenweise dem schwachen, mittleren und starken Kumys.

4. VIII. 2 Uhr mittags.

Milch		Katyk	
Milchsäure	0,0574	ca. 2,126	} Diese Zahlen sind berechnet.
Zucker	5,72	ca. 2,12	
Alkohol			

4. VIII. 2 Uhr mittags. Katyk gemischt mit Milch im Verhältnis 1:3		5. VIII. 2 Uhr mittags.	
	Milch		Intensität d. Milchsäure-gärung
Milchsäure	0,567	$1{,}142 - 0{,}567 = \mathbf{0{,}575}$	
Zucker	4,82	$4{,}82 - 4{,}07 = 0{,}75;\ 0{,}75 - 0{,}575 = \mathbf{0{,}175};\ 0{,}175 \frac{184}{360} = 0{,}089$	Intensität der Alkohol-gärung
Alkohol			0,089

5. VIII. 2 Uhr mittags.
Säuerung gemischt mit Milch (1:1)

		Intensität d. Milchsäure-gärung	Intensität der Alkohol-gärung	
Milchsäure	0,518	0,930 — *0,518* = ***0,412***		
Zucker	5,28	*5,28* — 4,63 = *0,65*; *0,65* — *0,412* = ***0,238***;		*0,121*
Alkohol	0,045			*0,045*
				0,166

6. VIII. 2 Uhr mittags.
Gemischt mit Milch (1:1)

Milchsäure	0,410	0,796 — *0,410* = ***0,386***		
Zucker	5,37	*5,37* — 4,76 = *0,61*; *0,61* — *0,386* = ***0,224***;		*0,115*
Alkohol	0,083			*0,083*
				0,198

7. VIII. 2 Uhr mittags.
Gemischt mit Milch (1:1)

Milchsäure	0,387	0,690 — *0,387* = ***0,303***		
Zucker	5,20	*5,20* — 4,57 = *0,63*; *0,63* — *0,303* = ***0,327***;		*0,167*
Alkohol	0,099			*0,099*
				0,266

8. VIII. 2 Uhr mittags.
Gemischt mit Milch (1:1)

Milchsäure	0,304	0,657 — *0,304* = ***0,353***		
Zucker	5,37	*5,37* — 4,00 = *1,37*; *1,37* — *0,353* = ***1,017***;		*0,520*
Alkohol	0,133			*0,133*
				0,653

8. VIII. 8 Uhr abends.
Gemischt mit d. halben Menge Milch[1]) (2:1)

Milchsäure	0,460	0,800 — *0,460* = ***0,340***		
Zucker	4,50	*4,50* — 2,80 = *1,70*; *1,70* — *0,340* = ***1,360***;		*0,695*
Alkohol	0,435			*0,435*
				1,130

9. VIII. 11 Uhr morgens.
Gemischt 3 Teile „Säuerung" und 2 Teile Milch (3:2)

9. VIII. 2 Uhr mittags.
Schwacher Kumys

Milchsäure	0,505	0,887 — *0,505* = ***0,382***		
Zucker	3,88	*3,88* — 2,22 = *1,66*; *1,66* — *0,382* = ***1,278***;		*0,650*
Alkohol	0,678			*0,678*
				1,328

NB. Die erhaltene Mischung stellt schon Maische vor, aus der nach 3 Stunden der „schwache" Kumys, nach 21 Stunden der „mittlere" und nach 34 Stunden der „starke" Kumys erhalten wird.

[1]) Die Menge Milch, die zur „Säuerung" zugesetzt wurde, pflegte der Empiriker-Baschkire, der den Kumys bereitete, nach dem Grad des Aufbrausens, dem Geschmack, Geruch und nach anderen empirischen Zeichen zu bestimmen.

Mittlerer Kumys

		Intensität d. Milchsäure-gärung	Intensität der Alkohol-gärung	
Milchsäure	1,100 — *0,505* = ***0,595***			
Zucker	*3,88* — 1,85 = *2,03; 2,03* — *0,595* = ***1,435;***			*0,750*
Alkohol				*0,678*
				1,428

10. VIII. 9 Uhr abends.

Starker Kumys

Milchsäure	1,141 — *0,505* = ***0,636***	
Zucker	*3,88* — 1,68 = *2,20; 2,20* — *0,636* = ***1,564;***	*0,800*
Alkohol		*0,678*
		1,478

Die Kumyse gelangen ziemlich gut, wenn auch etwas saurer als gewöhnlich. Letzteren Umstand kann man bei weiteren Bereitungen des Kumys durch Abänderung der Milchmengen, die zugesetzt werden, und der Temperaturbedingungen verbessern.

Die Tatsachen, die in der vorstehenden Tabelle angegeben sind, sind in zwei Kurvendiagrammen (Fig. 2 und 3) dargestellt.

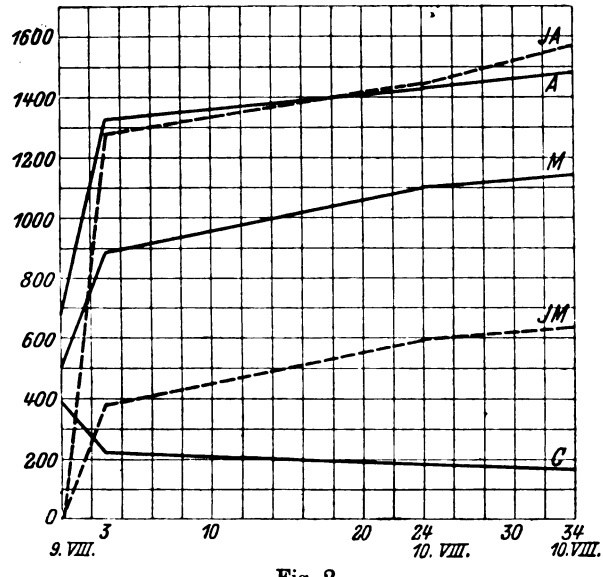


Fig. 2.

Das Diagramm des Kumys aus Katyk (von 11 Uhr morgens 9. VIII. bis 9 Uhr abends 10. VIII. 1908.)

Dieses Diagramm ist ebenso wie das der Figur 1 zusammengestellt. Die Bedeutung der Zahlen und Buchstaben ist dieselbe.

Das eine stellt (analog dem Kurvendiagramm auf S. 20) Kurven von dem Momente der Erhaltung der Maische, resp. vom 9. VIII. bis zu ihrer Verwandlung in schwachen, mittleren und starken Kumys vor, das zweite stellt den ganzen Prozeß dar, außer dem Befund für den schwachen und starken Kumys (es ist der mittlere angeführt), was seine Vergleichung mit dem Diagramm das später folgt, erleichtern soll.

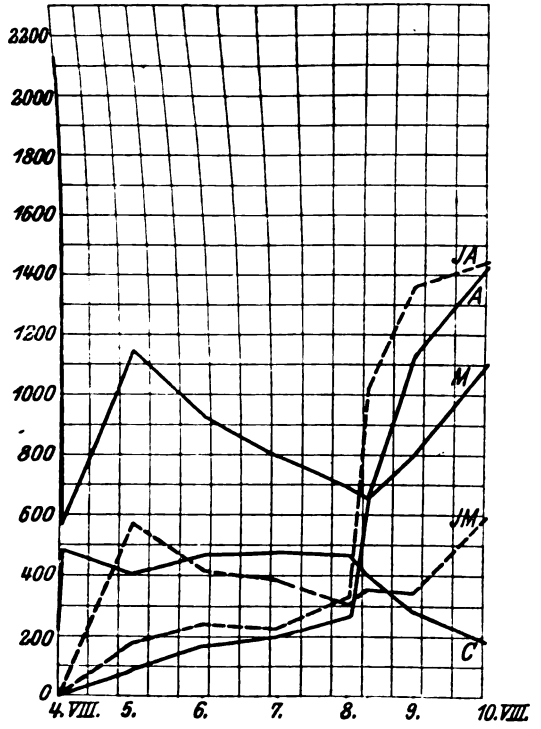


Fig. 3.

Das Diagramm des Kumys aus Katyk (von 2 Uhr mittags 4. VIII. bis 8 Uhr morgens 10. VIII. 1908.

Die Ordinate zeigt die Mengen des Alkohols und der Milchsäure in Milligrammen und die des Zuckers — in Zentigrammen; die Abszisse zeigt die Zeit (die eine Seite des Quadrats entspricht einer Periode von 10 Stunden) der Bestimmungen; *A*, *M*, *C*, *JA* und *JM* haben dieselbe Bedeutung, wie in der Figur 1.

Das erste Diagramm fällt fast mit demjenigen des normalen Kumys (S. 20) zusammen. Man sieht nun, daß die beiden Gärungsprozesse etwas intensiver verliefen. Wir werden uns

mit dem oben Angeführten begnügen und uns bei diesem Diagramm nicht mehr aufhalten.

Das zweite Diagramm zeigt, wie es zu erwarten war, daß bei der Bereitung des Kumys die anfangs sehr schwache Alkoholgärung allmählich wächst, bis endlich die Hefe, die sich vermehrt und sich anscheinend an die Gärung des (vielleicht auch schon invertierten), Milchzuckers, anpaßt (Inkubationsperiode), plötzlich sehr intensiv zu arbeiten beginnt. Das ist der Augenblick, wo man schon den Kumys zum Trinken bereiten kann, und wo man die bereits voll entwickelten Gärungsprozesse vorsichtig durch Änderungen der Temperatur regulieren muß. Außerdem zeigt das Diagramm, daß die Milchsäuregärung allmählich unter der Wirkung der anscheinend sich vollziehenden Anpassung der Milchsäurestäbchen des Katyks an die Stutenmilch und der Konkurrenz mit den Hefepilzen schwächer wird, bis sie sich angepaßt hat und normal zu arbeiten beginnt.

Die chemischen Vorgänge bei der Kumys- und Kefirgärung. II.

Über künstlichen Kumys und über Kefir.

Von

Alexander Ginzberg.

(Aus dem Laboratorium für pharmazeutische Chemie des medizinischen Fraueninstituts, Petersburg.)

(Eingegangen am 1. November 1910.)

Mit 1 Figur im Text und 1 Tafel.

Nachdem festgestellt worden war, daß die „Kumysgärung", wie in der voraufgehenden Mitteilung gezeigt wurde, der summarische Prozeß der zu einem bestimmten Gleichgewichte gebrachten Milchsäure- und Alkoholgärung ist, war es noch nötig, diese Tatsachen durch künstliche Darstellung des Kumys zu bestätigen. Zu diesem Zwecke mußte man die Stutenmilch mit den reinen Kulturen eines energisch wirkenden Milchsäurestäbchens und mit guter Hefe, die sich an die Stutenmilch anpassen konnte, impfen.

Diese Aufgabe habe ich in Petersburg im Januar 1909 mit vollem Erfolge gelöst.

Nach einer ganzen Reihe von Vorproben wählte ich die am meisten verbreiteten und überall leicht erhältlichen Fermente, die dem von mir gesetzten Ziele vollständig entsprachen.

Als Erreger der Alkoholgärung kann man die gewöhnliche flüssige Bierhefe gebrauchen, die bei Anwesenheit des Milch-

säurestäbchens schon am 5. bis 6. Tage sich an die neuen Bedingungen anpaßt und die Alkoholgärung entwickelt.[1])

Für die Milchsäuregärung eignet sich am besten das energisch wirkende bulgarische Stäbchen von Grigoroff, das jetzt so eng mit dem Namen von I. I. Metschnikoff verknüpft ist, und das durch die Laktobazillin-Gesellschaft „Ferment", die fast überall Filialen besitzt, leicht auf spezielle Bestellung in reiner Kultur zu erhalten ist.

Der künstliche Kumys wurde auf folgende Weise erhalten und kontrolliert.

Künstlicher Kumys.

Zur Bereitung des Kumys wurde am 5. I. 09 50 g reiner Kultur des bulgarischen Stäbchens, 50 g Hefe und 650 ccm Stutenmilch zusammengebracht, das Ganze gut und vorsichtig in einem Mörser verrieben und nachher in einem Glase durch eine Rührvorrichtung, die durch eine Turbine in Bewegung gesetzt wurde, $^1/_2$ Stunde lang umgerührt. Nach dem Umrühren wurde die Flüssigkeit in eine Flasche gebracht, verkorkt und bei einer Temperatur von 24 bis 26° C stehen gelassen.

Nach 24 Stunden wurde ein mikroskopisches Präparat gemacht, der Säuregehalt [mit Baryt[2])] und der Zuckergehalt bestimmt. Die Mischung wurde mit einer neuen Menge Milch vermischt, wie oben erwähnt bearbeitet und wieder für 24 Stunden stehen gelassen, und so weiter bis zum 16. I. 09. An diesem Tage war schon ein guter mittlerer Kumys fertig.

Die erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle, die wie die vorhergehende zusammengestellt ist, angegeben und graphisch ausgedrückt wie auf S. 21 und 23.

---

[1]) Dieselbe Hefe entwickelte ohne Milchsäurestäbchen in der Milch keine Alkoholgärung, auch nicht nach Verlauf von 2 Wochen. Sie wirkte sogar auch dann nicht, wenn man zur Milch bis 0,5% Milchsäure zugesetzt hatte.

Die Preßhefe lieferte bei Anwesenheit des Milchsäurestäbchens veränderliche Resultate, aber immer schwächere, als flüssige Hefe.

[2]) Wenn Baryt auch höhere Zahlen für die Säure gibt, so spielt das dort keine Rolle, wo nicht eine absolute Menge, sondern eine relative serienweise bestimmt werden soll. Dafür ist es bequemer, mit Baryt zu arbeiten, seinen Titer zu bestimmen und denselben zu kontrollieren.

5. I. Milch		5. I. Erste Mischung	
Milchsäure	0,057	0,131	
Zucker	6,25	5,63	
Alkohol	0	0	

5. I. Ausgangsgemisch		6. I. Intensität der Milchgärung	Intensität der Alkoholgärung	
Milchsäure	0,131	$0{,}422 - 0{,}131 = \mathbf{0{,}291}$		
Zucker	5,63	$5{,}63 - 5{,}54 = 0{,}09$;	$0{,}09 - 0{,}291 = -0{,}201$ (NB)	
Alkohol	0			0

6. I. Gemischt 1 Teil mit 2 Teilen Milch		7. I.		
Milchsäure	0,178	$0{,}863 - 0{,}178 = \mathbf{0{,}685}$		
Zucker	6,03	$6{,}03 - 5{,}35 = 0{,}68$;	$0{,}68 - 0{,}685 = -0{,}005$ (NB)	
Alkohol				0

7. I. Gemischt 1:2		8. I.		
Milchsäure	0,300	$0{,}972 - 0{,}300 = \mathbf{0{,}672}$		
Zucker	5,92	$5{,}92 - 5{,}27 = 0{,}65$;	$0{,}65 - 0{,}672 = -0{,}022$ (NB)	
Alkohol				0

8. I. Es wurde keine Milch vom Tataren, der mich mit ihr versorgte, geliefert, u. das Gemisch wurde auf T. 5° C gebracht.		9. I.		
		$1{,}000 - 0{,}300 = \mathbf{0{,}700}$		
		$5{,}92 - 5{,}27 = 0{,}65$;	$0{,}65 - 0{,}700 = -0{,}050$ (NB)	
				0

9. I. Gemischt 150 ccm mit 260 Milch[1])		10. I.		
Milchsäure	0,337	$0{,}938 - 0{,}337 = \mathbf{0{,}601}$		
Zucker	5,72	$5{,}72 - 5{,}19 = 0{,}53$;	$0{,}53 - 0{,}601 = -0{,}071$ (NB)	
Alkohol				0

10. I Gemischt 1:2		11. I.		
Milchsäure	0,328	$0{,}994 - 0{,}328 = \mathbf{0{,}666}$		
Zucker	5,92	$5{,}92 - 5{,}12 = 0{,}80$;	$0{,}80 - 0{,}666 = \mathbf{0{,}134}$; $0{,}134 \frac{184}{360} = 0{,}068$	
Alkohol				0,068

[1]) Infolge eines zufälligen Verlustes fehlte etwas Milch.

11. I. Vermischt 1:2 Milch		12. I. Intensität der Milchsgärung	Intensität der Alkoholgärung	
Milchsäure	0,328	0,910 — *0,328* = ***0,582***		
Zucker	6,03	*6,03* — 5,12 = *0,91*;	*0,91* — *0,582* = ***0,328***;	*0,167*
				0,023
Alkohol	0,023			0,190

12. I. Vermischt 1:2 Milch		13. I.		
Milchsäure	0,291	1,010 — *0,291* = ***0,719***		
Zucker	6,03	*6,03* — 4,22 = *1,81*;	*1,81* — *0,719* = ***1,091***;	*0,557*
				0,063
Alkohol	0,63			0,620

13. I. Vermischt 1:2 Milch		14. I.		
Milchsäure	0,300	1,005 — *0,300* = ***0,705***		
Zucker	5,63	*5,63* — 3,62 = *2,01*;	*2,01* — *0,705* = ***1,305***;	*0,665*
				0,207
Alkohol	0,207			0,872

14. I. Vermischt 150 g „Säuerung“ mit 200 T. Milch		15. I.		
Milchsäure	0,422	1,015 = *0,422* = ***0,593***		
Zucker	5,04	*5,04* — 3,12 = *1,92*;	*1,92* — *0,593* = ***1,327***;	*0,677*
				0,374
Alkohol	0,374			1,051

15. I. Vermischt gleiche Teile		16. I. Mittlerer Kumys		
Milchsäure	0,450	0,994 — *0,450* = ***0,544***		
Zucker	4,97	*4,97* — 2,84 = *2,13*;	*2,13* — *0,544* = ***1,586***;	*0,809*
				0,526
Alkohol	0,526			1,335

Beim Durchsehen der angeführten Zahlen müssen wir zunächst diejenigen, die mit dem Zeichen NB versehen sind, hervorheben. Es ist natürlich unmöglich, daß sich mehr Milchsäure gebildet haben soll, als zur Milchsäuregärung Zucker verbraucht wurde, und die erhaltenen Zahlen können nur auf folgende Weise erklärt werden.

Unter der Wirkung der Milchsäure, auch möglicherweise des Milchsäurestäbchens oder dessen Fermentes, hydrolysiert sich der Milchzucker zu Galaktose und Traubenzucker, deren

Gesamtgewicht gleich dem des angewandten Milchzuckers ($C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$) ist. Bei Titrierung von solchen invertierten Zuckerlösungen bekommt man Zahlen, die dem Milchzucker nicht entsprechen und bei der Berechnung immer höher als in der Wirklichkeit sind.[1])

Wenn wir annehmen, was höchst wahrscheinlich ist, daß bei Anwesenheit der Kultur des Milchsäurestäbchens in der Milch bis zum Beginn der Alkoholgärung eine bestimmte Menge von invertiertem Milchzucker vorhanden ist, so werden die negativen Zahlen für Alkohol erklärt, die man bei der Berechnung durch Subtraktion eines zu großen Subtrahenden erhält, um so mehr, als das Diminutivum unmittelbar nach dem Zusetzen frischer Milch, aber der Subtrahend erst nach 24 Stunden, das heißt nach dem Verlaufe der Hydrolyse, bestimmt wurde.

Es wird deshalb richtig sein, die Menge des Alkohols während der ersten 5 Tage gleich 0 zu setzen, erst vom 11. I. begann der Alkohol zu erscheinen. Unter anderem wurde 1 Tag vorher die Bildung von Kohlensäuregas bemerkt, was sich dadurch zu erkennen gab, daß beim Öffnen der Flasche der Korken leicht herausgeschleudert wurde. Es ist höchst wahrscheinlich, daß die Monosaccharide (invertierter Milchzucker) zu gären begonnen hatten.

Das Anwachsen des Kohlensäuregases wurde täglich bemerkt; am 15. I. und 16. I. bekam man schon Produkte, die beim Öffnen der Flaschen aufbrausten und heftig hinausgeschleudert wurden wie gewöhnlicher Kumys.

Das angegebene Diagramm für diesen Kumys (Fig. 1) stimmt auffallend mit dem für den Kumys aus dem Katyk überein, nur beginnt in letzterem Falle die Alkoholgärung, wenn auch

---

[1]) Man nimmt gewöhnlich an, daß in 1%igen Zuckerlösungen 1 ccm Fehlingscher Lösung durch 0,00675 g Milchzucker, 0,00500 g Traubenzucker und 0,00511 g Galaktose reduziert wird, auf diese Weise wird 1 ccm Fehlingscher Lösung durch $\left(\frac{0{,}00500 + 0{,}00511}{2}\right) = 0{,}00505$ g invertierten Zuckers reduziert, was bei dem Ignorieren der Inversion auf 0,00675 berechnet worden ist. Wenn also beim Titrieren von 10 ccm der Fehlingschen Lösung, z. B. 12 ccm oder 15 ccm der Zuckerlösung verbraucht wurden, so wurde eine größere Menge von Zucker berechnet, als in der Wirklichkeit in Form von schon invertiertem Zucker vorlag.

schwach, schon am ersten Tage, weil er eine an das milchsauere Medium bereits gewöhnte Hefe, wenn auch involuzierte, enthält.

Im letzteren Versuche mit Bierhefe hat diese sich an die Milch anpassen, sozusagen eine lange Inkubationsperiode durchmachen müssen, bis endlich die Kurve der Alkoholgärung vom 11. I. an bestimmt und kräftig in die Höhe stieg; das ist der Moment, wo die Kumysgärung resp. die summarische Milchsäure- und Alkoholgärung schon begonnen hat.

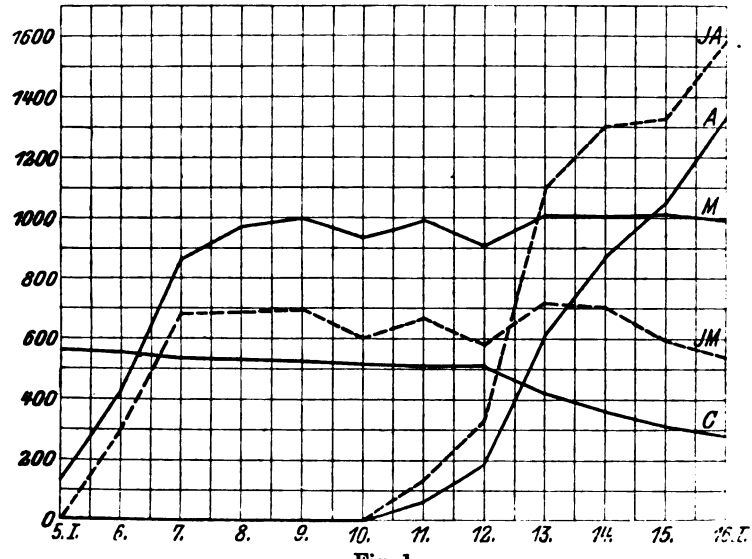


Fig. 1.

Das Diagramm des künstlichen Kumys (von 5. I. bis 16. I. 1909). Die Buchstaben und Zahlen haben dieselbe Bedeutung wie auf den ersten Diagrammen, nur an der Abszisse entsprechen zwei Quadrate einer Periode von 24 Stunden.

Der erhaltene künstliche Kumys wurde mit dem natürlichen, der aus einer aus der Steppe mitgebrachten Säuerung während der Versuche zubereitet worden war, verglichen.

Weder im Aussehen noch im Geschmacke konnte ein bemerkbarer Unterschied festgestellt werden.

Zur vollständigen Sicherung der Identität des erhaltenen Produktes mit natürlichem Kumys wurde ein Versuch gemacht, um die Anwesenheit der Peptone festzustellen.

Die Flüssigkeit wurde in einen Dialysator gebracht und stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurden mittels der Fehling-

schen Lösung im äußeren Wasser Spuren von Peptonen festgestellt, und nach weiteren 24 Stunden war die Biuretreaktion schon ganz deutlich.

Das mikroskopische Präparat des künstlichen Kumys, der wie oben geschildert erhalten worden ist, ist sehr ähnlich den Präparaten des Steppenkumys, wie aus dem auf der Tabelle unter Nr. 4 gegebenem Mikrophotogramme des Schlußstadiums zu ersehen ist.

Dieser Versuch der Bereitung des Kumys erklärt vollständig das Wesentliche und den Verlauf der Kumysgärung und gibt gleichzeitig eine Anleitung, wie man Kumys leicht und einfach, überall wo nur Stutenmilch oder die ihr ähnliche Esel- oder Maultiermilch zu erhalten ist, herstellen kann.

Kefir.

Die Zubereitung und das Studium des Kefirs ist dank der Existenz der Kefirkörner, die eine Symbiose von Mikroorganismen darstellen, die die Kefirgärung bedingen, viel leichter als die Zubereitung und das Studium des Kumys.

Mit dem Studium der chemischen und bakteriologischen Seite des Kefirs beschäftigten sich sehr viele russische und westeuropäische Forscher, unter anderem sind einige größere Arbeiten zu erwähnen, wie z. B. von Kern (1881), Podwyssozky (Über Kefir, 5. Auflage, 1901), Essaulow (1895), Beyerink (1889 und 1902), Scholl (1897), Freudenreich (1897) Kotzyn (1897) usw.

Auch hier gibt es viele Widersprüche. Einige Forscher finden Kokken (Freudenreich, Essaulow), andere dagegen finden sie nicht. Manche hielten das lange Stäbchen für den spezifischen Kefir-Mikroorganismus Bacillus caucasicus, Lactobacillus (Kern, Beyerink, Freudenreich), andere dagegen halten es für den Bacillus subtilis [Essaulow, Podwyssozky (für ein ihm nahestehendes)], andere wieder schreiben ihm die Fähigkeit zu Eiweißstoffe zu peptonisieren [Essaulow (nur vermutend), Stange, Scholl] u. a. sprechen ihm jede Rolle bei der Kefirgärung ab, halten es nur für nötig zur Bildung von Stroma der Kefirkörner (Freudenreich, Essaulow), und allein Freudenreich (1897) zeigte, ohne ihm eine große Bedeutung zuzuschreiben, daß der Bacillus caucasicus fähig ist, große Mengen Milchsäure zu bilden, ohne die Ausfällung von Casein hervorzurufen.

So stand die Frage, als die Arbeit von E. Nikolaewa[1]) (1907) aus dem Laboratorium des Prof. G. Nadson in dem medizinischen Fraueninstitut in St. Petersburg erschien.

---

[1]) Bull. du Jardin Imp. botan. de St. Petersbourg 7, 4, 121.

Diese Arbeit stellte genau fest, daß im Kefir zwei Grund-Mikroorganismen vorhanden sind. Der eine ruft die Milchsäuregärung, der andere die Alkoholgärung hervor. Alle anderen Mikroorganismen (Bacterium Güntheri, Torula ellypsoidea, Streptococcus lacticus, Bacillus mesentericus usw.), die im Kefir vorkommen, sind schädliche oder unschädliche Beimischungen. Das große Stäbchen wurde Bacterium caucasicum genannt; es bedingt die Milchsäuregärung und bringt die Milch zum Gerinnen, wobei es bei günstigen Temperaturbedingungen fähig ist, in einer reinen Kultur 2 bis 3% Säure zu entwickeln.

Der zweite beständige Mikroorganismus, Torula Kefir, ruft eine energische Alkoholgärung hervor, wobei er auch fähig ist, Milchzucker in Gärung zu bringen.

Auch in diesem Falle ist der Versuch der Gewinnung des künstlichen Kefirs mittels Impfung der Milch mit Bacterium caucasicum und Torula Kefir gelungen.

Wir sehen hier, daß auch die „Kefirgärung" ein summarischer Prozeß der in einem bestimmten Verhältnisse parallel verlaufenden Milchsäure- und Alkoholgärung ist.[1]) Zu diesem Schlusse sind u. a. Nikolaewa und seinerzeit auch Freudenreich (1897) gelangt.

Nach den oben angeführten Beobachtungen über Kumys werden jetzt auch die anderen bei der Kefirgärung verlaufenden Prozesse klar, wie z. B. die Peptonisierung der Eiweißstoffe der Milch, der Verlust des Caseins an Calciumoxyd und eines Teiles der Phosphorsäure, einige Details bei der technischen Bereitung des Kefirs usw.

Die chemische Zusammensetzung des Kefirs, dessen mittlere Zahlen in der Tabelle Seite 4 angeführt sind, diente auch

[1]) Unlängst ist eine größere Abhandlung von Kuntze erschienen (Centralbl. f. Bakt. usw. II. Abt., 24, Nr. 5/7, 101). In dieser Arbeit führt der Verfasser eingehend die Literatur und seine experimentellen Untersuchungen an und hält die Kefirgärung für einen summarischen Prozeß, der von vier Arten von Mikroorganismen bedingt ist: 1. aus der Gruppe des Streptococcus acidi lactici; 2. aus der Gruppe des Bacterium acidi lactici; 3. aus der Gruppe der Torula und Saccharomyces und 4. aus der Gruppe der Buttersäurebacillen (Bacillus esterificans und der vom Verfasser festgestellten Art der Bacillus Kefir).

Seine Folgerungen basiert der Verfasser darauf, daß beim Impfen der Milch mit der Mischkultur der oben erwähnten Mikroorganismen es ihm gelungen ist, ein Getränk, das dem Kefir ganz ähnlich war, zu bekommen und hauptsächlich darauf, daß er bei längerer Arbeit mit der Mischkultur eine Bildung von dicken Klumpen, die den Kefirkörnern ähnelten, beobachten konnte. Der Verfasser selbst spricht seine Ansichten bis auf weiteres nur vermutungsweise aus.

lange Zeit als Objekt vieler Forschungen, unter denen nach dem Studium der Eiweißstoffe und der Genauigkeit der Analysen hauptsächlich die Angaben von Biel[1]) (1886) hervorzuheben sind.

Beim Vergleichen der Zusammensetzung des Kefirs und des Kumys sehen wir, daß die einzelnen Gärungsprozesse bei der „Kefirgärung" weniger intensiv verlaufen als bei der „Kumysgärung".

Der Gärung ist nur etwa die Hälfte des Zuckers unterworfen, wobei die Alkoholgärung schwächer verläuft und nur ca. 1% Alkohol liefert, während bei dem Kumys die Menge des Alkohols 2 bis 3% erreicht[2]) unter gleichzeitiger reichlicher Bildung von Kohlensäure.

Parallel mit der Verringerung der Intensität der Milchsäure- und besonders der Alkoholgärung (mit Bildung von Kohlensäure) werden auch die Eiweißstoffe schwächer hydrolysiert, wobei sie aber dieselben Veränderungen erleiden wie beim Kumys (der Unterschied ihres Charakters wird durch die Verschiedenheit der Ausgangsmilch bedingt).

Menge der Eiweißstoffe in:

	Kumys	Kefir
Casein . . .	1,17%	2,77%
Albumin . .	0,42 „	0,25 „
Acidalbumin .	0,16 „	0,11 „
Hemialbumose	0,44 „	0,28 „
Peptone . .	0,19 „	0,05 „

Wenn man wie beim Kumys (Seite 19 und 21) eine Flasche Kefir mit einer gleichen Menge Milch zusammenmischen, die Quantität des Zuckers, der Milchsäure, des Alkohols (des letzteren durch Berechnung) bestimmen, und die Mischung in drei Flaschen verteilen, in jeder den Zucker und die Säure

[1]) Nach Biel l. c. und anderen russischen Forschern führten auch Hammarsten (1888), Habermann (1890) und Niederstadt (1890) Analysen von Kefir aus. Ihre Zahlen brachten nichts Neues, sie sind mit den Literaturangaben bei König l. c. angeführt.

[2]) Wenn starke Kumyssorten nicht in der Kälte aufbewahrt werden, vergärt der ganze Zucker schon am 3. bis 4. Tage, und die von Eiweißstoffen befreite Flüssigkeit pflegt die Fehlingsche Lösung nicht mehr zu reduzieren, jedoch fand Biel (nicht angegeben, wie Kefir aufzubewahren ist) noch am 9. Tage über 2% Zucker.

nach 6, 24 und 36 Stunden oder in anderen Intervallen titrieren würde, so könnte man Zahlen und Kurven bekommen, die die Intensität der Milchsäure- und Alkoholgärungen anweisen würden. Dieselben Beobachtungen können auch die Normen für die Kefirgärung geben.

Wir können also jetzt die Frage der „Kumys- und Kefirgärung" vom chemischen Standpunkte aus als vollständig gelöst und vereinfacht betrachten. Und wenn wir die chemischen Normen für Kumys (siehe die Kurven) haben, ist es leicht, ihn jetzt überall zu bereiten.

Zusammenfassung.

1. Kumys und Kefir sind Produkte aus Milch, die unter der Wirkung von biologischen Erregern und durch zwei parallel verlaufende Prozesse: Milchsäure- und Alkoholgärung verändert worden ist.

2. Diese beiden Prozesse rufen nicht nur die Verwandlung des Milchzuckers in Milchsäure, Alkohol und Kohlendioxyd hervor, sondern sie bewirken auch eine ganze Reihe von Veränderungen im Casein und in den Eiweißstoffen der Milch, indem dem Casein die mineralischen Bestandteile entzogen und die Eiweißstoffe hydrolysiert (peptonisiert) werden.

3. Da der Kumys und der Kefir Flüssigkeiten darstellen, in denen fortwährend biologisch-chemische Prozesse verlaufen, die ebenso abhängig sind von den Mengenverhältnissen zwischen den Mikroorganismen und der Milch, wie von den Temperatur- und Zeitbedingungen, so ist die Gradierung nach Tagen oder Stunden oder nach Terminen: schwacher (junger und alter), mittlerer (junger und alter) und starker Kumys (junger und alter) unbedingt zu unterlassen. Es ist richtiger, die rein chemischen Normen, die auf der Intensität des Prozesses basieren, festzustellen, wozu es, wie auf Seite 33 gezeigt wurde, nur nötig ist, den Kumys oder Kefir mit einer gleichen Menge Milch zu verdünnen, die Mischung in drei Portionen zu verteilen und dieselben reif werden zu lassen. Wenn wir jetzt für jede Stufe die Menge der Milchsäure (allgemeiner Säuregehalt der Flüssigkeit auf Milchsäure umgerechnet), die Menge des Zuckers und die Menge des Alkohols bestimmen (im äußersten Fall

kann man sich auch mit der Bestimmung des Säuregehalts und der Menge des Zuckers[1]) begnügen), so bekommen wir Normen, die uns die Möglichkeit geben, die Kumys- und Kefirgärung zu verfolgen. Es ist klar, daß man parallel auch die bakteriologischen Bestimmungen zu machen hat, wenn sie auch nur Angaben über die Qualität der Flora von Kumys und Kefir, aber keine über den Grad der Reife dieser Getränke geben.

Die schon ausgeführten Analysen liefern eine Reihe von Angaben für die chemischen Normen, aber genauere Grenzen müssen von Klinikern vorgezeichnet werden, je nach den verschiedenen therapeutischen Effekten, die sie von diesen Getränken fordern.

4. Da die „Kumys- und Kefirgärung" nichts anderes sind als in einem bestimmten Verhältnis verlaufende Milchsäure- und Alkoholgärung, so kann man Kumys und Kefir durch gleichzeitiges Impfen der Stuten- resp. Kuhmilch mit den Erregern des einen und des anderen Prozesses erhalten. Die morphologische Art des Erregers spielt keine große Rolle, obwohl es besser ist, starke Vertreter zu nehmen. Für die Milchsäuregärung erscheint als sehr passend das bulgarische Stäbchen Grigoroff-Metschnikoffs, das aus Stutenmilch mit Bierhefe einen sehr gut schmeckenden Kumys liefert.[2])

5. Die Reinheit der Kumysflora zeigt, daß bei der Anwesenheit großer Mengen von Milchsäurestäbchen andere Mikroorganismen mit Ausnahme von Hefe sich nicht erfolgreich entwickeln, aber die Milchsäurestäbchen töten sie nicht, sondern verzögern nur ihre Entwicklung. Deshalb ist es nötig, bei der Bereitung des Kumys und des Kefirs möglichst eine bakteriologische Reinheit zu bewahren.

6. Die Verschiedenheit im äußeren Aussehen, in den Eigenschaften und in der Art der Bereitung des Kumys und des Kefirs, die man aus Stuten- (Kumys) und Kuhmilch (Kefir) erhält, ist, abgesehen von manchen anderen unwichtigen Unter-

[1]) Aus einer Serie derartiger Bestimmungen kann man sich eine Vorstellung über die Menge des Alkohols in der Flüssigkeit machen, wie es in dieser Arbeit geschah, aber diese Zahlen werden immer höher sein, als in Wirklichkeit (s. S. 17).

[2]) Dr. Dmitriew in Jalta bekam einen guten Kumys, indem er Stutenmilch mit Kefirkörnern vergor.

schieden, in den anderen Bestandteilen hauptsächlich durch die Verschiedenheit des Caseins bedingt. Das Casein der Kuhmilch ist geneigt, große Klumpen zu bilden, welche die Mikroorganismen umhüllen und sie behindern, frei zu funktionieren, was bei der Bereitung des Kumys in diesem Maße nicht der Fall ist. Das ist die Ursache, weshalb man bei der Bereitung des Kefirs ihn öfter und stärker umrühren muß als bei der Bereitung des Kumys. Diese Eigenschaften des Caseins der Kuhmilch ebenso wie die Anwesenheit einer größeren Menge desselben in der Milch bedingen die dicke Konsistenz des Kefirs, während der Kumys dünnflüssig und leicht zu trinken ist. Wenn man den Kefir mit gut umgerührter Sauermilch, d. h. mit einer Speise vergleichen kann, so ist der Kumys nur ein Getränk.

7. Hinsichtlich der Versuche, Kumys aus Kuhmilch zu bereiten, indem man sie mit Wasser verdünnt und zu ihr Milchzucker zugibt, kann man a priori sagen, daß die Versuche erst dann erfolgreich sein werden, wenn es gelingen wird, auf die eine oder andere Weise das Casein der Kuhmilch[1]) zu verändern und es den Eigenschaften nach dem Casein der Stutenmilch (resp. Frauenmilch) näher zu bringen.

Es wäre wohl auch möglich, Kumys aus der Milch der Esel und der Maultiere zu bereiten.

8. Wie das große Literaturmaterial zeigt, schwankt die Zusammensetzung der Stutenmilch in bestimmten Grenzen und hängt von einer ganzen Reihe günstiger oder ungünstiger Bedingungen ab. Es ist aber kein Anlaß vorhanden, dem Steppenfutter eine spezifische Wirkung auf die Stuten zuzuschreiben, denn wenn die Stuten aus der Steppe in die Städte (St. Petersburg, Moskau) gebracht werden, geben sie, mindestens in den ersten Jahren, ebensoviel und ebenso gute Milch.

9. Das Trinken des Kumys unterscheidet sich dem Charakter, folglich auch der Wirkung nach gänzlich von demjenigen des Kefirs. Kumys trinkt man zum Unterschiede vom Kefir gewöhnlich nicht weniger als 3 bis 5 l täglich. Auf diese Weise werden dem Organismus große Mengen von Flüssigkeit zugeführt. Man bekommt hier eine Analogie mit dem

[1]) Vielleicht durch Einwirkung von Pepsin usw. auf Casein.

Trinken vieler Mineralwässer, wobei, wie bekannt ist, die Energie der osmotischen Prozesse im Organismus und in einzelnen Zellen der Gewebe erhöht wird. Man bekommt, um so zu sagen, ein reichliches und systematisches Ausspülen des Organismus, dabei noch mit einer sehr nahrhaften Flüssigkeit. Es ist, als ob die Materie der Zellen und der Gewebe des Organismus erneut werde (Alterans).

10. Beim Vergleichen der Wirkung des Kumys- und des Kefir-Trinkens müssen wir den ersteren bedeutend vorziehen. Das wird durch die große Menge, die getrunken wird, und durch die Bedingungen, unter denen er genossen wird, bewirkt.

Man kann hier noch bemerken, daß Studien über Kumys und Kefir unter diejenigen Forschungen gehören, die jetzt über Lactobacillin nach Metschnikoff in vielen Kliniken und Spitälern in großer Menge oft mit staunenswertem Erfolge ausgeführt werden.

Kumys, auch Kefir (hauptsächlich Kumys), der dem Organismus systematisch und im Laufe einer bestimmten Periode zugeführt wird, tritt (außer auf die Ernährung und Erneuerung des Organismus einzuwirken), dank seiner mykologischen Bevölkerung, mit der vorhandenen bakterischen Flora des Darmtraktes, die nicht selten eine Erkrankung des Organismus bedingt,[1]) in Kampf und, indem er beständig Verstärkung bekommt, besiegt er sie endlich und verdrängt sie aus dem Darmkanal.

Auf diese Weise entsprechen Kumys und Kefir in der Form, wie sie genossen werden, vollständig der von Metschnikoff formulierten Bedingung der Verlängerung des menschlichen Lebens[2]): „die wilde Flora des Darmkanals des Menschen in eine kultivierte zu verwandeln".

[1]) E. Metschnikoff, Essais optimistes, 1907.

[2]) E. Metschnikoff, Essais sur la Nature humaine 1903.

Tafelerklärung.

Alle Bilder sind mit Agfa-Chromoplatten aufgenommen.

Vergrößerung: ca. 300mal und ca. 2000mal (Immersionssystem von Zeiß).

A 1 (Vergr. ca. 300) und *A 1* (Vergr. ca. 2000). Die Hefezellen kommen selten vor, sogar nicht in jedem Gesichtsfelde, und in den meisten Fällen zeigen sie eine unnormal lange Form (Involutionsformen).

B 7. Die Menge der Hefezellen wächst nestartig deutlich an.

C 1. Die Hefezellen normaler Form vermehren sich.

C 7. Die Hefezellen aus den durch Umschütteln zerbrochenen Nestern ordnen sich gleichmäßiger an.

D 1 (Vergr. ca. 300) und *D 1* (Vergr. ca. 2000). Auf beiden Mikrophotogrammen ist eine und dieselbe Stelle aufgenommen.

D 7. Es erscheinen Kolonien schon fast abgerundeter Hefezellen.

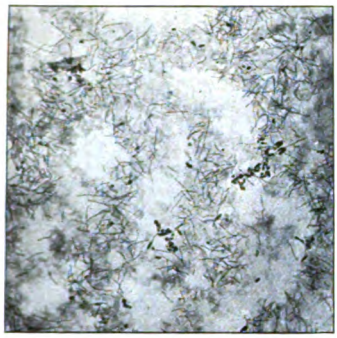
G und weitere. Die Verteilung der Milchsäurestäbchen und der Hefezellen ist eine gleichmäßige.

Nr. 1. Schwacher Kumys.

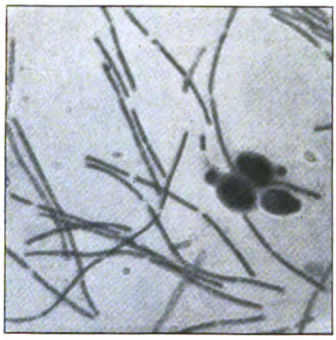
Nr. 2. Mittlerer Kumys (Vergr. ca. 300).

Nr. 3. Mittlerer Kumys (Vergr. ca. 2000).

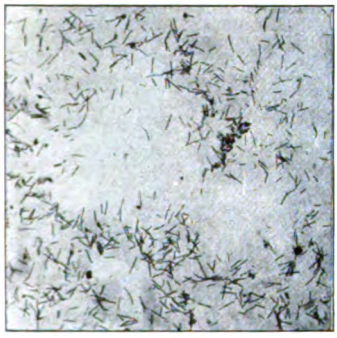
Nr. 4. Künstlicher Kumys (Vergr. ca. 2000).



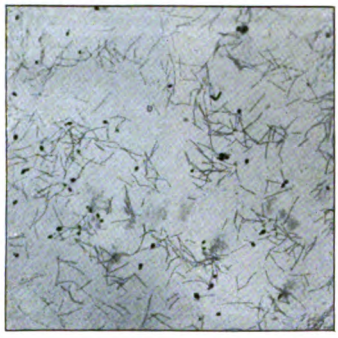
B_7



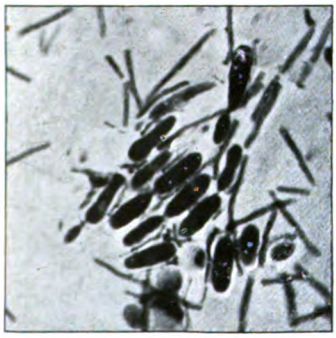
D_1



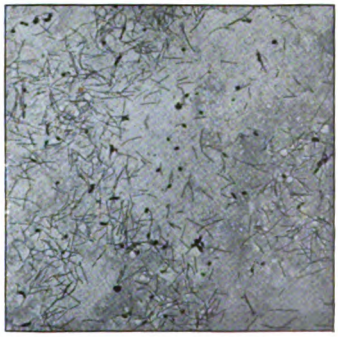
A_7



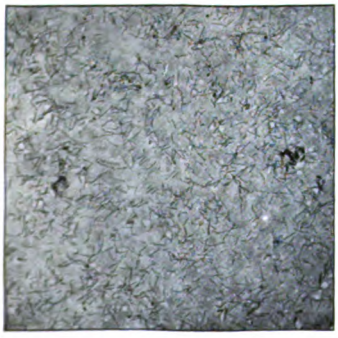
D_1



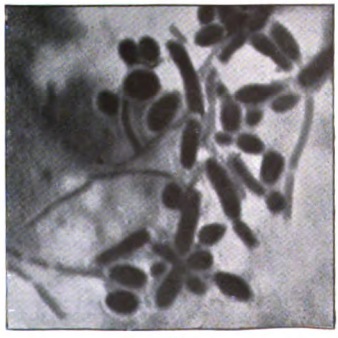
A_1



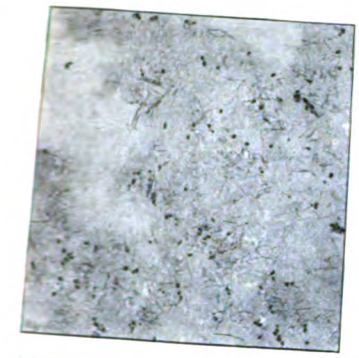
C_7



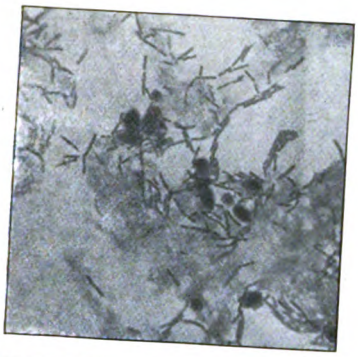
A_1



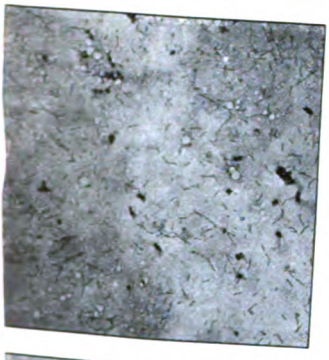
C_1



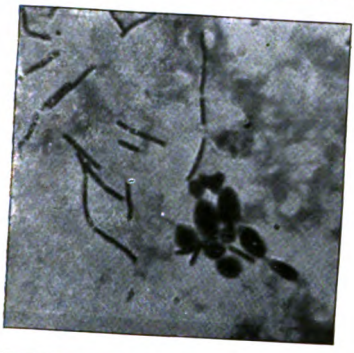
G



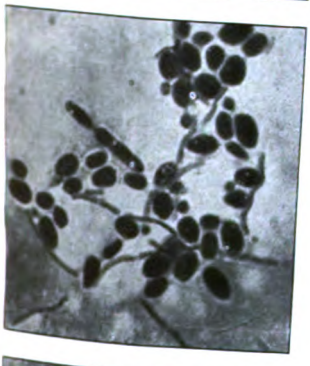
Nr. 4



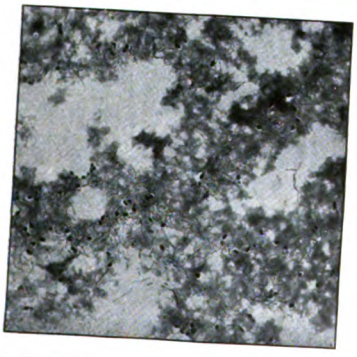
F_2



Nr. 3

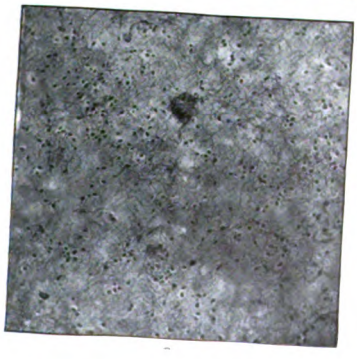


E



Nr. 2

D



Nr. 1

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Diastase und Handelslecithin.

Von

Herman Lapidus.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 5. November 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

Durch Untersuchungen der letzten Zeit ist es mehrmals nachgewiesen worden, daß Lipoidstoffe in mehreren Beziehungen Enzymwirkungen beeinflussen können.

So zeigte Küttner[1]) für proteolytische Enzyme, besonders Pepsin, daß Handelslecithin je nach der Konzentration eine befördernde oder hemmende Wirkung ausüben konnte. Neumann[2]) fand eine starke Hemmung der Trypsinwirkung durch Ölseife. Nach Pick und Pribram[3]) kann man durch Ätherextraktion die antitryptische Wirkung des Serums aufheben, was Schwartz[4]) bestätigte, während K. Meyer[5]) sich ablehnend verhält. Unsere Kenntnis der Lipoide für Fermentwirkungen ist also sehr lückenhaft. Andrerseits liegt doch die Möglichkeit vor, daß dieselben besonders für die intracelluläre Enzymarbeit — z. B. als Regulatoren — eine gewisse, vielleicht große Bedeutung besitzen. So führt Phosphorvergiftung eine starke Veränderung der Zellipoide herbei. Andererseits findet hier sogar eine starke intracelluläre Autolyse statt. Bei Hefezellen bekommt man bekanntlich durch Äthervergiftung eine starke Autolyse. Nach Bang[6]) und besonders Starkenstein[7]) wird

---

[1]) Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 472, 1907.

[2]) Neumann, Berl. klin. Wochenschr. 46, 1908.

[3]) Pick und Pribram, Wiener klin. Wochenschr. 1908, 17.

[4]) Schwartz, Wiener klin. Wochenschr. 1909, 33; Berl. klin. Wochenschr. 1909, 48.

[5]) K. Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 1909, 42.

[6]) Bang, Ergebn. d. Physiol. 1909, 463.

[7]) Starkenstein, diese Zeitschr. 24, 191, 1910.

die Wirkung der intracellulären Leberdiastase durch eine vorausgehende Alkoholbehandlung (= Entfernung gewisser Lipoide) vergrößert.

Ich bin deswegen gern dem Vorschlag Prof. Bangs gefolgt, zu untersuchen, wie sich die tierischen Diastasen bei Gegenwart von Lipoiden verhalten. Von den Diastasen wurden Ptyalin, Pankreasdiastase, Darmdiastase und Serumdiastase untersucht. Es wäre voraussichtlich interessant, nachzusehen, wie sich die Diastase in einem so komplizierten System wie Serum gegenüber dem einfachen Ptyalin bei Gegenwart von Lipoiden verhielte. Zwischen beiden steht in dieser Beziehung das Pankreasferment.

Ich hatte anfangs die Absicht, sowohl Handelslecithin wie das native, rein dargestellte Phosphatid zu untersuchen und zu vergleichen. Aus äußeren Gründen war es mir jedoch unmöglich, den letzten Teil der Aufgabe durchzuführen, und ich habe deshalb nur das Handelslecithin untersuchen können.

Methodik.

Zur Verwendung kamen gewöhnliche Kartoffelstärke als $2^0/_0$iger Stärkekleister (8 ccm), Enzymlösung (0,2 — 0,5 — 1,0 ccm), Lecithinlösung (0,2 — 0,5 — 1,0 ccm) und Wasser bis 10 ccm. Das Lecithin war „Agfa"-Lecithin als $10^0/_0$ige methylalkoholische Lösung (Stammlösung). Von dieser wurde für die Versuche durch Verdünnung mit Wasser eine $1^0/_0$ige Lecithinlösung dargestellt. Die Versuchstemperatur war teils Zimmertemperatur, teils Körpertemperatur. Nach Küttner verhält sich das Lecithin bei diesen Temperaturen ungleich. Nach einer gewissen Zeit (1 bis 24 Stunden) wurde die Lösung zur Zerstörung des Enzyms und Koagulation des Eiweißes aufgekocht (gewöhnlich wurden zur besseren Entfernung des Eiweißes 2 bis 3 Tropfen Essigsäure zu der kochenden Lösung zugesetzt), mit 10 ccm Wasser verdünnt, filtriert und nach Bang titriert. Der Zucker wird hiernach als Traubenzucker berechnet — eine Reduktionstabelle für Maltose war noch nicht ausgearbeitet worden. Ich habe deswegen durch Versuche mit reiner Maltoselösung die entsprechenden Werte für Maltose austitriert und in folgender Tabelle zusammengestellt. Die fetten Ziffern sind experimentell gefunden, die übrigen interpoliert.

Tabelle I.

Die Maltoselösung enthielt 0,8991 g Maltose auf 100 ccm Wasser.

Maltose in mg	Verwendete Hydroxylaminlösung ccm	Differenz für mg	Dextrose in mg	Maltose in mg	Verwendete Hydroxylaminlösung ccm	Differenz für mg	Dextrose in mg
9	42.45		6,34	50	19,59		
10	41,92			51	19,08		
11	41,38			52	18,56		
12	40.84			53	18,05		
13	40.30			54	17,54	0,51	33,24
14	39,76			55	17,03		
15	39,22			56	16,53		
16	38,68			57	16,02		
17	38,14			58	15,52		
18	37,60	0,54	10,8	59	15,02		
19	37,05			60	14,51		
20	36.45			61	14,01		
21	35,90			62	13,50		
22	35,30			63	13,00	0,50	39,0
23	34,75			64	12,58		
24	34,20			65	12,17		
25	33.60			66	11,75		
26	33,05			67	11,34		
27	32,45	0,57		68	10,92		
28	31,90			69	10,50		
29	31.30			70	10,08		
30	30,75			71	9,67		
31	30.20			72	9,25	0,42	44,35
32	29.60			73	8,85		
33	29,05			74	8,45		
34	28,45			75	8,05		
35	27,90			76	7,65		
36	27,30	0,57	21,44	77	7,25		
37	26,73			78	6,85		
38	26,15			79	6,45		
39	25,58			80	6,05		
40	25.01			81	5,65	0,40	50,43
41	24,44			82	5,27		
42	23,87			83	4,88		
43	23.29			84	4,48		
44	22,72			85	4,07		
45	22,15	0,57	27,52	86	3,68		
46	21,64			87	3,28		
47	21,12			88	2,89		
48	20.61			89	2,49		
49	20,10			90	2,10	0,39	57,1

Der Übersicht halber ist eine graphische Darstellung über das Reduktionsverhältnis zwischen Maltose und Dextrose zur Bangschen Kupferlösung beigefügt (s. S. 42).

Wie ersichtlich, reduziert die Maltose die Bangsche Kupferlösung bedeutend schwächer als Dextrose, durchschnittlich etwa

wie 2 : 3. Die Befunde stimmen vollständig mit den von anderen Forschern bei Fehlings Lösung u. a. Reduktionsflüssigkeiten gefundenen überein.

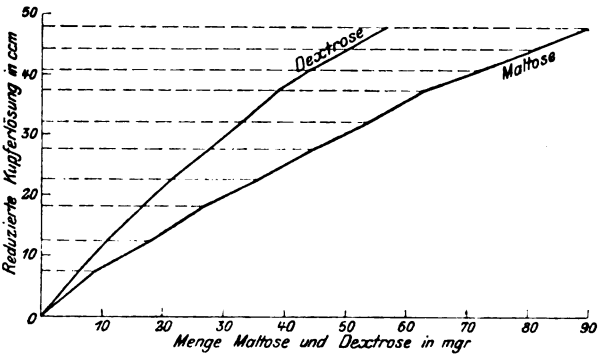


Fig. 1.

Betreffs der Versuchszeit haben Chittenden und Ely[1]) gefunden, daß der größte Teil der Stärke fast unmittelbar nach dem Zusatz des Ptyalins in Zucker umgebildet wird. Bei der Einwirkung von 12 ccm Speichel auf 0,5 g Stärke als 1%ige Lösung waren bei 40° nach 1 Minute 40%, nach 5 Minuten 44%, nach 10 Minuten 45%, nach 1 Stunde 51% und nach 2 Stunden 52% umgebildet. Vernon[2]), der den gebildeten Zucker als Maltose berechnete, hat identische Werte gefunden. Recht gut hiermit übereinstimmend sind auch meine eigenen Versuche, wie die nebenstehende Tabelle II zeigt.

Die obigen Versuche zeigen, daß bei Gegenwart von nur wenig Saliv (0,2 ccm) die Verzuckerung besonders bei 16 bis 18° immer beinahe gleichmäßig während der ersten Stunde fortgeht. Bei 0,5 ccm Saliv und besonders bei 1,0 ccm Saliv dagegen ist nach 15 Minuten nicht viel weniger Zucker gebildet wie nach 1 bis 24 Stunden, und zwar geht der Umsatz bei Zimmer- und Körpertemperatur ziemlich gleichmäßig vor sich. Bei 0,2 ccm Saliv war dagegen die Zuckerbildung bei 37° in den ersten Minuten bedeutend intensiver als bei 16 bis 18°, obwohl das schließliche Resultat bei 37° mit dem bei 18° erhaltenen recht nahe übereinstimmte. Überall ist ferner gefunden worden, daß nach

[1]) Chittenden und Ely, The chem. News 1882.

[2]) Vernon, Journ. of Physiol. 28, 1902.

1 Stunde beinahe ebensoviel Stärke umgebildet worden ist wie nach 24 Stunden, was für die Lecithinversuche wichtig war.

Tabelle II.

Speichel	Zeit der Fermentwirkung	Zimmertemperatur				Körpertemperatur			
		Gebildeter Zucker berechnet als							
		Dextrose		Maltose		Dextrose		Maltose	
ccm	Min.	mg	Proz. d. Stärke	mg	Proz. d. Stärke	mg	Proz. d. Stärke	mg	Proz. d. Stärke
0,2	5	12,3	7,7	19,7	12,3	20,6	12,9	34,4	21,5
„	15	19,5	12,2	33,6	21,0	35,0	21,9	56,9	35,6
„	30	30,2	18,9	48,8	30,5	51,2	32,0	82,2	51,4
„	45	43,6	27,3	73,0	45,6	53,6	33,5	88,3	55,2
„	60	48,6	30,4	80,7	50,4	54,6	34,1	89,2	55,8
„	60×24	60,1	37,6	97,6	61,0	64,8	40,5	106,6	66,7
0,5	5	30,5	19,1	49,6	31,0	46,5	29,1	75,4	47,1
„	15	48,0	30,0	77,6	48,5	60,1	37,6	97,6	61,0
„	30	55,2	34,5	90,2	56,4	61,1	38,2	99,5	62,2
„	45	57,7	36,1	92,7	57,9	63,0	39,4	102,8	64,3
„	60	60,6	37,9	98,8	61,8	63,8	39,9	103,9	64,9
„	60×24	73,1	44,4	118,5	74,1	80,2	50,2	129,9	81,2
1,0	5	37,7	23,6	61,0	38,1	53,4	33,4	87,4	54,6
„	15	52,4	32,8	85,9	53,7	61,0	38,1	99,2	62,0
„	30	56,6	35,4	92,5	57,8	62,5	39,1	101,5	63,4
„	45	56,9	35,6	92,9	58,1	62,5	39,1	101,5	63,4
„	60	57,5	35,9	93,7	58,6	64,5	40,3	106,2	66,4
„	60×24	58,5	36,6	95,0	59,4	75,0	46,9	121,8	76,1

Bei den Lecithinversuchen war es von Interesse, nachzusehen, wie die Bestimmung nach Wohlgemuths[1]) Verfahren, verglichen mit der direkten Titration des durch Hydrolyse erhaltenen Zuckers sich verhielt. Nach Wohlgemuth wird nämlich die zurückgebliebene Stärke bestimmt, die also als die Differenz der Titrationswerte erscheinen. Hierbei zeigte sich aber, daß Wohlgemuths Methode völlig unbrauchbar war, wie aus der Tabelle III ersichtlich ist.

Tabelle III.

Speichel	Lecithin	H_2O	Stärkelösung	Zeit Min.	Maltose mg	Färbung mit J
0,5	0,5	1,0	8	5	39,3	Rot
0,5	—	1,5	8	5	41,0	Blau
0,5	0,5	1,0	8	30	81,0	Rotviolett
0,5	—	1,5	8	30	93,7	Blau

[1]) Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

Schon nach der Bildung von 39,3 mg Maltose ist die Farbe, bei Gegenwart von Lecithin, durch Jod rot geworden, während ohne Lecithin die Probe sogar nach Bildung von 93,7 mg eine rein blaue Farbe besitzt. Die Ursache hierfür ist selbstverständlich, daß das Jod auch mit dem Lecithin reagiert, und also zwischen Lecithin und Stärke verteilt wird. Deswegen bleibt nicht genügend Jod für die Stärke übrig, um eine blaue Farbe zu geben. Dementsprechend kann man auch allein durch Zusatz von einer passenden — sogar recht kleinen — Lecithinmenge zur ursprünglichen Stärkelösung die Färbung durch Jod sehr beeinträchtigen.

Diese Tatsache zeigt auch, daß Wohlgemuths Verfahren bei der Verwendung von Organextrakten sehr bedenklich sein muß. Der obige Lecithingehalt war etwa 1:4000. Bekanntlich enthalten viele Organe, z. B. die Leber, die besonders nach Wohlgemuth untersucht worden ist, viel mehr ungesättigte Phosphatide. Hierzu kommen auch die Triglyceride der ungesättigten Fettsäuren, die sämtlich mit Jod reagieren und sogar viel davon aufnehmen. Es ist ohne weiteres ganz klar, daß hierdurch die Brauchbarkeit der Methode — insofern man nicht einen Überschuß von Jod verwendet — ganz illusorisch sein muß. Z. B. kann es passieren, daß a-Teile Stärke mit Jod noch reagierten, während $a - x$ es nicht mehr tun, obwohl letzteres noch eine beträchtliche Stärkemenge repräsentieren kann!

Ptyalin-Lecithinversuche.

Von meinen recht zahlreichen Versuchen hierüber sei als Beispiel eine Serie angeführt, aus der die Bedeutung des Lecithins ganz klar hervorgeht. Sie stimmen übrigens alle überein. (Überall unten, 0,5 ccm Saliv, 8 ccm 2%ige Stärke mit H_2O auf 10 ccm ergänzt. Zeit der Ptyalinwirkung 60 Minuten.)

Tabelle IV.

Lecithin	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	104,0	—	—	106,6	—	—
0,2	97,6	− 6,4	− 6,2	105,7	− 0,9	− 0,8
0,5	90,2	− 13,8	− 13,3	105,4	− 1,2	− 1,1
1,0	79,3	− 24,7	− 23,8	102,3	− 4,3	− 4,0

Wie ersichtlich läßt sich keine befördernde, sondern eine unter Umständen stark hemmende Wirkung durch Lecithin erzielen. In dieser Beziehung stimmt also Ptyalin mit den übrigen untersuchten Enzymen überein. Weiter geht aus der Tabelle hervor, daß die Hemmung bei Zimmertemperatur viel größer ist als bei Körpertemperatur. Da nun weiter die Zuckerproduktion ohne Lecithin bei 18° und 37° beinahe gleich groß ist, tritt diese Lecithinhemmung um so deutlicher hervor. Die Hemmung ist absolut und relativ gleich groß, und zwar bewirken 0,2 ccm Lecithin bei Zimmertemperatur eine größere Hemmung als die 10-fache Lecithinmenge bei 37°. Man darf auch das Lecithin bei Zimmertemperatur als ein starkes Gift für das Ptyalin bezeichnen, da eine Konzentration von 1:5000 die Ptyalinwirkung ganz unzweifelhaft beeinflußt.

Hierbei ist aber die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß vielleicht nicht das Lecithin selbst, sondern der zur Auflösung des Lecithins verwendete Methylalkohol für die Hemmung verantwortlich sein könnte, um so mehr, als Linossier[1]) für denselben eine solche Hemmungswirkung beschrieben hat. Es wurden demgemäß Kontrollversuche angestellt, wobei eine 1%ige Lösung von Methylalkohol in Wasser ohne Lecithin zur Verwendung kam.

Tabelle V.

Methylalkohol	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	104,0	—	—	106,6	—	—
0,2	100,7	−4,7	−4,5	107,1	+0,5	+0,5
0,5	102,3	−2,3	−2,2	107,1	+0,5	+0,5
1,0	102,0	−2,0	−1,9	106,6	0	0

Der Methylalkohol ist also bei diesen Konzentrationen indifferent. Schließlich bleibt noch übrig, nachzusehen, wie sich eine mit Wasser allein ohne Methylalkohol bereitete Lecithinlösung verhält (s. Tabelle VI, S. 46).

Eine rein wässerige L-Lösung stimmt also ganz genau mit einer methylalkoholisch-wässerigen überein, und die gefundene Hemmung entspricht demnach dem Lecithin selbst.

[1]) Linossier, Malys Jahresberichte 1900.

Tabelle VI.

Lecithin in H_2O	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	104,0	—	—	106,6	—	—
0,2	94,9	— 9,1	— 8,8	103,1	— 3,5	— 3,3
0,5	88,8	— 15,2	— 14,6	102,5	— 4,1	— 3,8
1,0	85,3	— 18,7	— 18,0	105,7	— 0,9	— 0,8

Schließlich ist es wichtig zu untersuchen, wie sich die L-Hemmung bei größerer oder kleinerer Speichelkonzentration verhält. Da die Hemmung bei konstanter Salivkonzentration mit steigender L-Menge beinahe proportional ansteigt, dürfte man z. B. bei kleinerer Salivkonzentration eine noch größere bzw. vollständige Aufhebung der Ptyalinwirkung erwarten können. In den obigen Versuchen war die Salivmenge überall 0,5 ccm, in den folgenden Versuchen dagegen nur 0,2 ccm. Da bei Körpertemperatur hier aber keine oder nur geringe Hemmung stattfand, führe ich nur einen Versuch bei Zimmertemperatur an.

Tabelle VII.

Lecithin	Zimmertemperatur		
	Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%
—	80,0	—	—
0,2	80,7	+ 0,7	+ 0,9
0,5	73,4	— 6,6	— 8,3
1,0	61,8	— 18,2	— 22,8

Hieraus ist also ersichtlich, daß auch mit 0,2 ccm Saliv die Hemmung entsprechende Werte wie bei 0,5 ccm Saliv aufweist. Hieraus läßt sich folgern, daß keine feste Verbindung zwischen Lecithin und Saliv entsteht. Im Gegenteil scheint es, als ob wir es hier mit einer Verteilung des Ptyalins zwischen einer wässerigen und einer Lecithin-Phase zu tun haben.

Pankreasdiastase-Lecithinversuche.

Küttner und Neumann haben schon bewiesen, daß Lecithin auf die Trypsindigestion hemmend wirkt. Meine Versuche zeigen, daß dies auch für die Pankreasdiastase zutrifft.

Die Diastase war ein wässeriges Extrakt aus Pankreas, das mit dem gleichem Volum Glycerin versetzt worden war. Diese

Lösung wurde filtriert. Das Extrakt zeigte bei Körpertemperatur eine mit Speichel übereinstimmende Wirkung, bei Zimmertemperatur dagegen war es viel schwächer. (Übrigens war der Speichel auch etwas variabel.) Pankreasextrakt 0,5 ccm. Zeit der Diastasewirkung: 60 Minuten.

Tabelle VIII.

Lecithin	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	92,6	—	—	105,4	—	—
0,2	91,8	− 0,8	− 0,9	104,2	− 1,2	− 1,1
0,5	83,5	− 9,1	− 9,8	100,7	− 4,7	− 4,5
1,0	81,8	− 10,8	− 11,7	94,8	− 10,6	− 10,1

Diese Ergebnisse stimmen mit den beim Saliv gefundenen recht gut überein. Doch ist zu bemerken, daß beim Pankreasextrakt auch bei Körpertemperatur eine nicht unerhebliche Hemmung gefunden worden ist, die nicht sehr viel hinter derjenigen bei Zimmertemperatur zurücksteht. Insofern ist die Pankreasdiastase vom Ptyalin verschieden. Bei der Pankreasdiastase ist aber zu berücksichtigen, daß hier ein viel unreineres Extrakt vorliegt. Besonders ist der Eiweißgehalt bedeutend. Es war deswegen geraten, nachzusehen, wie sich der Methylalkohol gegenüber Pankreasdiastase verhielt. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den Ptyalinversuchen. Pankreasextrakt 0,5 ccm.

Tabelle IX.

1%iger Methylalkohol	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	92,6	—	—	105,4	—	—
0,2	95,3	+ 2,7	+ 2,9	105,4	0	0
0,5	95,3	+ 2,7	+ 2,9	107,4	+ 2,0	+ 1,9
1,0	100,4	+ 7,8	+ 8,4	102,3	− 3,1	− 2,9

Im Gegensatz zum Ptyalin bewirkt also der Methylalkohol bei Zimmertemperatur eine unzweifelhaft befördernde Wirkung. Bei Körpertemperatur ist Methylalkohol dagegen ziemlich indifferent. Dies Verhältnis bleibt also zu berücksichtigen, wenn man die Lecithinhemmung beurteilen will. In den folgenden Versuchen wurde deswegen eine rein wässerige Lecithinlösung verwendet.

Tabelle X.

Lecithin in H_2O	Zimmertemperatur			Körpertemperatur		
	Maltose	Differenz		Maltose	Differenz	
ccm	mg	mg	%	mg	mg	%
—	92,6	—	—	105,4	—	—
0,2	89,5	− 3,1	− 3,3	102,3	− 3,1	− 2,9
0,5	82,8	− 9,8	− 10,6	98,0	− 7,4	− 7,0
1,0	78,0	− 14,6	− 15,8	92,6	− 12,8	− 12,1

Bei Verwendung einer wässerigen Lecithinlösung findet man also, wie vorhergesehen, eine größere Hemmung bei Zimmertemperatur als bei Gegenwart von Methylalkohol. Dies ist auch bei Körpertemperatur der Fall, obgleich die Werte hier etwas geringer sind als bei Zimmertemperatur. Überall findet man also eine hervortretende Hemmung durch das Lecithin. Durchschnittlich ist die Hemmung bei Zimmertemperatur etwas geringer, bei Körpertemperatur größer als in den Ptyalinversuchen. Die vielen übrigen, hier nicht angeführten Versuche mit Pankreasdiastase zeigten alle hiermit übereinstimmende Ergebnisse.

Darmsaftdiastase-Lecithinversuche.

Diese Versuche wurden mit einem glycerin-wässerigen Extrakt aus Darmschleimhaut vom Rind angestellt. Die Diastase war aber recht schwach: 1 ccm Enzymlösung bewirkte während 24 Stunden bei 37° nur ca. 12 bis 15% und bei 18° nur 6 bis 7% Maltosebildung. Deswegen wurden nur einige orientierende Versuche mit Lecithin angestellt. Hierbei wurde bei 37° eine Aktivierung durch methylalkoholische Lecithinlösung gefunden. Methylalkohol aber bewirkte eine noch größere Aktivierung, und wenn eine rein wässerige Lecithinlösung zur Verwendung kam, wurde tatsächlich auch hier eine Hemmung gefunden, die also bei Gegenwart von Methylalkohol maskiert worden war.

Serumdiastase-Lecithinversuche.

Während die vorher besprochenen Enzymlösungen recht einfache und konstante Verhältnisse aufgewiesen haben, haben die Serumversuche außerordentlich komplizierte, schwer verständliche Ergebnisse geliefert. Dies war jedoch schon aus dem Grunde a priori zu erwarten, weil Serum im Gegensatz zum

Speichel eine sehr zusammengesetzte Flüssigkeit darstellt. Wir haben schon früher beim Vergleich von Pankreasextrakt und Speichel gefunden, daß das mehr kompliziert zusammengesetzte Pankreasextrakt sich nicht so einfach wie der Speichel verhält. Und Serum ist noch viel komplizierter zusammengesetzt als das Pankreasextrakt.

Besonders die Lipoide des Serums können je nach dem Alter des Tieres, Jahreszeit, Nahrungszustand, Gesundheit (Wassermannsche Reaktion!) sicher Unterschiede aufweisen. Weiter ist das spontan ausgepreßte Serum nicht mit dem durch Zentrifugieren von defibriniertem Blute völlig identisch, wie ich in einem Versuche gefunden habe. Ferner ist das Alter des Serums ein nicht unwichtiges Moment. Besonders Morawitz[1]) hat für das Fibrinferment bzw. dessen Antifermente im Serum mit dem Alter des Serums bedeutende Unterschiede nachweisen können. Schließlich können fremde Stoffe wichtige Veränderungen des Serums bewirken. So fanden Pick und Pribram[2]) nach Ausschütteln mit Äther ganz veränderte Verhältnisse des Serums gegenüber der Wassermannschen Reaktion.

Ähnliche große Unterschiede lassen sich auch betreffs der Serumdiastase nachweisen. Dies trifft sowohl für die Diastase an sich, wie auch für die Wirkung des Lecithins und des Methylalkohols zu.

Es war deswegen zuerst notwendig, die Diastase allein unter verschiedenen Verhältnissen zu studieren. Ich bemerke gleich, daß es mir nicht gelungen ist, alle diese schwierigen Verhältnisse völlig klar zu legen. Doch dürfte allein der Nachweis von der Existenz derartiger Erscheinungen von Bedeutung sein.

Daß das Serum schon beim Stehen allein verändert wird, geht erstens aus der Tatsache hervor, daß die Diastasewirkung nicht konstant bleibt, sondern immer sich verändert. In einem Versuche ergaben 0,5 ccm Serum (in allen Serumversuchen war das Serum hergestellt durch Zentrifugieren von defibriniertem Blute, in Kälte aufbewahrt, die Zeit der Stärkedigestion 24 Stunden und jede Probe mit 0,06 ccm = 3 Tropfen Toluol, um sie steril zu halten, versetzt), 6 Stunden alt, 57,5 mg Maltose,

[1]) Morawitz, Ergebn. d. Physiol. 1905, 307.

[2]) Pick und Pribram, zitiert nach Bang, Ergebn. d. Physiol. 1909.

24 Stunden alt, 77,6 mg und 48 Stunden 78,3 mg Maltose, alles bei 37°; bei Zimmertemperatur waren die Werte 56,6 — 64,0 — 62,1 mg. In einem anderen Versuche bei 2 Stunden altem Serum 68 mg, nach 22 Stunden 77,2 mg und nach 46 Stunden 81,44 mg Maltose (alles bei 37°). Bei 18° waren die Werte 63,5 — 59,0 — 66,0 mg.

Noch frappantere Werte zeigen die Sera vor und nach dem Ausschütteln mit Äther, wie die folgende Tabelle erweist.

Tabelle XI.

Alter des Serums Stunden	Ausschütteln mit Äther		
	Maltose vor mg	Maltose nach mg	Differenz %
—	61,5	29,3	— 52,4
—	74,0	60,6	— 18,1
37° 1	73,2	54,2	— 25,9
37° 20	68,8	27,5	— 60,0
37° 44	69,2	60,2	— 13,0
37° 6	57,5	66,0	+ 14,8
37° 24	77,6	66,0	— 15,0
37° 48	78,3	72,4	— 7,5
18° 6	56,6	48,6	— 14,1
18° 24	64,0	—	—
18° 48	62,1	54,8	— 11,8
37° 2	68,0	61,1	— 10,1
37° 22	77,2	69,6	— 9,8
37° 46	81,4	66,3	— 18,6
18° 2	63,5	57,0	— 10,2
18° 22	59,0	52,9	— 10,3
18° 46	66,0	54,8	— 19,4

Ein Blick auf die Tabelle wird über die großen Unterschiede der Serumdiastase vor und nach dem Ätherausschütteln überzeugen. Unterschiede von — 52,4 bis + 14,8% sind hier gefunden worden; gewöhnlich sind sie jedoch viel kleiner, aber überall weit größer als die möglichen Versuchsfehler. Versucht man aus den Werten eine Gesetzmäßigkeit zu finden, so kann man zwar sagen, daß die Diastasewirkung gewöhnlich, obwohl nicht immer, nach dem Ätherausschütteln kleiner ist als vorher. Man kann wohl hieraus mit einiger Wahrscheinlichkeit folgern, daß gewisse, für die Diastase aktivierend wirkende Lipoidstoffe durch den Äther entfernt worden sind. Da man nun weiter beobachten kann, daß die Diastasewirkung mit dem Alter des Serums

gewöhnlich ansteigt, so wäre es denkbar, daß solche Lipoide nach und nach freigemacht worden sind. Demgemäß konnte man erwarten, daß die prozentische Diastaseverminderung nach dem Atherausschütteln mit dem Alter des Serums auch ansteigen sollte. Dies findet auch gewöhnlich dort statt, wo das Serum mit dem Alter eine gesteigerte Diastasewirkung aufweist. In der Tat liegen aber sicher kompliziertere Verhältnisse vor, indem eine nicht geringe Zahl von Ausnahmen von dieser Regel gefunden worden sind. Infolgedessen bleibt auch die obige Schlußfolgerung recht unsicher.[1])

Unter diesen Umständen darf man auch auf Schwierigkeiten betreffs der Lecithinwirkung vorbereitet sein. Anderseits dürften auch die Lecithinversuche vielleicht einen näheren Einblick der Verhältnisse erlauben.

Gehen wir jetzt zu diesen Versuchen über, so haben die bei Zimmertemperatur angestellten das übersichtlichste Ergebnis geliefert. Sie sollen darum zuerst mitgeteilt werden. Versuchsanordnung wie oben. Nach der Inversion wurde das Eiweiß durch Kochen und Essigsäure entfernt.

Tabelle XII.

Temperatur 18°.

Zusatz	Lecithin in H_2O		Lecithin in Methylalkohol		Methylalkohol		
	Differenz		Differenz		Differenz		
ccm	mg	%	mg	%	mg	%	
0,2	− 4,7	− 10,1	− 1,9	− 4,5	+ 1,8	+ 4,3	Serum 6 bis 7 St. alt. Maltosebildung ohne Lecithin oder Methylalkohol = 42,8 mg
0,5	− 8,0	− 19,0	− 3,1	− 7,3	+ 1,8	+ 4,3	
1,0	− 14,7	− 34,8	− 9,5	− 22,5	− 9,5	− 22,5	
0,2	− 0,9	− 2,2	− 0,9	− 2,2	0	0	Serum 56 Stunden alt. Maltosebildung ohne Lecithin oder Methylalkohol = 41,8 mg
0,5	− 7,3	− 17,5	− 3,8	− 9,1	+ 0,7	+ 1,7	
1,0	− 17,0	− 40,6	− 7,3	− 17,5	0	0	

Die Versuche zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der früher untersuchten Enzyme, Ptyalin und Pankreasdiastase. Lecithin, besonders in wässeriger Lösung, bewirkt überall eine starke Hemmung. Methylalkohol allein

[1]) Inwieweit die Glykolyse hierbei von Bedeutung ist, bleibt noch unentschieden. In diesem Falle müssen die Serumlipoide besonders mit dem glykolytischen Ferment reagieren.

scheint oft eine befördernde Wirkung auszuüben. — Weit komplizierter und widersprechender sind die Lecithinversuche bei Körpertemperatur. In den folgenden zwei Tabellen sind die Versuche hierüber zusammengestellt.

Tabelle XIII.

Temperatur 37°.

Zusatz	Lecithin in H_2O		Lecithin in Methylalkohol		Methylalkohol		
	Differenz		Differenz		Differenz		
ccm	mg	%	mg	%	mg	%	
0,2	− 7,7	− 12,5	− 2,6	− 4,2	− 6,5	− 10,6	Maltosebildung ohne Lecithin oder Methylalkohol: 61,5 mg
0,5	+ 8,3	+ 13,5	− 0,3	− 0,4	+ 3,1	+ 5,0	
1,0	+ 13,8	+ 22,4	+ 5,8	+ 9,4	− 12,3	− 20,0	

Bald kommt eine Hemmung, bald aber eine befördernde Wirkung vor. Lecithin in Wasser und mit Methylalkohol verhält sich etwas verschieden. Die Ergebnisse mit Methylalkohol allein können diesen Unterschied nicht erklären. Durchschnittlich kann man aber sagen, daß, wie bei Ptyalin und Pankreasdiastase, das Lecithin bei Körpertemperatur keine oder eine geringe Hemmung ausübt, eher läßt sich eine befördernde Wirkung nachweisen. Der Methylalkohol scheint bisweilen die Verzuckerung zu befördern, bisweilen zu hemmen. In anderen Versuchen kamen die Verhältnisse typischer hervor, wo der Einfluß von dem Alter des Serums bemerkbar ist.

Tabelle XIV.

Temperatur 37°.

Alter des Serums	Zusatz	Lecithin in H_2O		Lecithin in Methylalkohol		Methylalkohol		
		Differenz		Differenz		Differenz		
St.	ccm	mg	%	mg	%	mg	%	
2	0,2	+ 5,1	+ 6,9	+ 0,6	+ 0,8	+ 1,3	+ 1,8	Maltosemenge ohne Lecithin und Methylalkohol = 73,2 mg
2	0,5	− 5,2	− 7,1	− 3,2	− 4,4	0	0	
2	1,0	+ 5,1	+ 6,9	− 8,1	− 11,1	+ 3,0	+ 4,1	
20	0,2	− 10,2	− 14,8	− 7,3	− 10,6	− 10,2	− 14,8	Maltosemenge ohne Lecithin und Methylalkohol = 68,8 mg
20	0,5	− 5,3	− 7,8	− 1,8	− 2,6	− 13,0	− 18,9	
20	1,0	+ 0,8	+ 1,2	− 1,3	− 1,9	+ 0,4	+ 0,6	
44	0,2	− 2,9	− 4,2	− 2,1	− 3,0	+ 1,2	+ 1,7	Maltosemenge ohne Lecithin und Methylalkohol = 69,2 mg
44	0,5	+ 3,2	+ 4,6	− 4,5	− 6,5	+ 0,4	+ 0,5	
44	1,0	− 6,5	− 9,4	− 0,8	− 1,2	+ 0,8	+ 1,2	

Überall ist dasselbe Serum verwendet worden. Wie man sieht, verändern sich die Werte etwas mit dem Alter. Beinahe überall ist jedoch durch die Einwirkung des Lecithins eine Hemmung nachgewiesen worden, die jedoch schwächer ist als die bei Zimmertemperatur. Also eine gewisse Übereinstimmung mit den früher untersuchten Enzymen. Der Methylalkohol ist in diesen Versuchen ziemlich indifferent.

Wir haben oben gesehen, daß beim Ausschütteln des Serums mit Äther die Wirkung der Diastase sich konstant vermindert. Die Möglichkeit lag recht nahe, daß hierdurch gewisse, die Diastasewirkung befördernde Lipoide entfernt worden sind. Deswegen war es recht naheliegend zu untersuchen, wie sich mit Äther behandelte Sera nach Zusatz von Lecithin verhielten. In der folgenden Tabelle sind solche Versuche zusammengestellt. Das Serum war dasselbe wie in den Versuchen der Tabelle XIV.

Tabelle XV.

Temperatur 37°.

Alter des Serums	Zusatz	Lecithin in H_2O Differenz		Lecithin in Methylalkohol Differenz		Methylalkohol Differenz		
St.	ccm	mg	%	mg	%	mg	%	
2	0,2	+ 19,2	+ 35,4	+ 3,4	+ 6,3	+ 10,5	+ 19,4	Maltosemenge nach Ätherausschütteln = 54,2 mg
2	0,5	+ 18,9	+ 34,9	+ 2,0	+ 3,7	+ 5,6	+ 10,3	
2	1,0	+ 10,9	+ 20,1	+ 3,4	+ 6,3	+ 13,8	+ 25,5	
20	0,2	+ 24,8	+ 90,2	+ 14,0	+ 50,9	+ 35,6	+129,5	Maltosemenge nach Ätherausschütteln = 27,5 mg
20	0,5	+ 28,7	+104,4	+ 17,4	+ 63,3	—	—	
20	1,0	+ 33,1	+120,4	+ 25,1	+ 88,5	+ 10,6	+ 38,5	
44	0,2	+ 0,9	+ 1,5	+ 20,9	+ 34,7	− 27,5	− 45,7	Maltosemenge nach Ätherausschütteln = 60,2 mg
44	0,5	+ 9,0	+ 15,0	0	0	+ 0,9	+ 1,5	
44	1,0	+ 6,9	+ 11,5	0	0	− 0,3	− 0,5	

Es geht aus den Versuchen unzweideutig hervor, daß das Lecithin bei den mit Äther behandelten Seris eine ausgesprochen aktivierende Wirkung besitzt, und zwar von der Größe, daß die ursprünglichen Werte der Diastasewirkung erreicht werden. Der Methylalkohol allein zeigt ebenfalls in den meisten Versuchen eine fördernde Wirkung, obwohl weniger hervortretend. Daß die obigen Ergebnisse nicht vereinzelt dastehen, beweisen mehrfach wiederholte Untersuchungen mit übereinstimmendem Ergebnis, doch waren die absoluten Werte sonst gewöhnlich

nicht so groß. Diese Versuche zusammen mit den Ausschüttelungsversuchen machen die Annahme recht wahrscheinlich, daß die Lipoide des Serums bei der Diastasewirkung von Bedeutung sind.

Wir haben bis jetzt ausschließlich Rinderserum untersucht. Es war zum Vergleich von Interesse, auch mit anderen Sera und besonders Menschenserum Versuche anzustellen. Im Gegensatz zum Rinderserum war die Diastasewirkung des Menschenserums (von Placentarblut) nur sehr gering (in 3 Versuchen mit 0,5 ccm Serum bei 37° in 24 Stunden 17,8, 15,5 und 15,0 mg Maltose), weshalb nur Versuche bei Körpertemperatur angestellt worden sind. In dem folgenden Versuche war das Serum 8 Stunden alt. 0,5 ccm ohne Lecithin oder Methylalkohol ergaben 17,8 mg Maltose. Versuchsanordnung wie oben.

Tabelle XVI.

Zusatz	Lecithin in H_2O Differenz		Lecithin in Methylalkohol Differenz		Methylalkohol Differenz	
ccm	mg	%	mg	%	mg	%
0,2	+ 4,1	+ 22,5	+ 2,3	+ 12,9	+ 0,4	+ 2,2
0,5	+ 4,1	+ 22,5	+ 1,1	+ 6,2	0	0
1,0	+ 4,1	+ 22,5	+ 3,0	+ 16,8	0	0

Das Lecithin hat überall eine relativ stark befördernde Wirkung ausgeübt. Menschenserum ist also in dieser Beziehung von Rinderserum verschieden. Dagegen stimmen die Ergebnisse mit den Versuchen bei den mit Äther behandelten Rinderseris überein. Methylalkohol allein war indifferent.

Schüttelt man Menschenserum mit Äther, so beobachtet man auch hier eine beträchtliche Verminderung der Diastasewirkung ganz wie beim Rinderserum (17,8 vor und 13,8 mg Maltose nach Ätherausschütteln). Auch hier bewirkt Lecithinzusatz eine starke Aktivierung. Im obigen Falle von 13,8 bis 18,2, 18,2 und 17,8 mg Maltose bei 0,2 — 0,5 — 1,0 ccm Lecithin in Wasser wie gewöhnlich.

Schließlich habe ich einige Versuche mit Syphilisserum angestellt. Wie bekannt, zeigt das Syphilisserum mit Lipoidstoffen zusammen sehr charakteristische Veränderungen. Ebenfalls nach Ausschütteln mit Äther. Pick und Pribram er-

hielten aus mit Äther behandelten Luessera Wassermannsche Reaktion direkt ohne Zusatz von Lipoidextrakten. Es war deswegen interessant nachzusehen, wie sich die Diastase des Luesserums beim Zusatz von Lecithin bzw. beim Ausschütteln mit Äther verhielt.

Tabelle XVII.

Zusatz	Lecithin in Wasser Differenz		
ccm	mg	%	
0,2	+ 2,6	+ 8,7	Gebildete Maltosemenge ohne Lecithinzusatz 29,7 mg Maltose
0,5	+ 5,2	+ 17,5	
1,0	+ 5,9	+ 19,8	

Aus diesem Versuch geht hervor, daß Syphilisserum reicher an Diastase ist als gewöhnliches: 29,7 mg Maltose hier gegen 17,8 beim Placentarblut. Inwieweit dies aber konstant und von Bedeutung ist, kann aus den wenigen angestellten Versuchen nicht beurteilt werden. Eine deutliche aktivierende Wirkung erscheint hier bei Zusatz von Lecithin wie bei den normalen Seris.

Beim Ausschütteln mit Äther wurde eine starke Verminderung der Diastasewirkung beobachtet — im obigen Versuche von 29,7 mg Maltose bis 18,5, eine Differenz von 37,7% — und eine Aktivierung nach Zusatz von Lecithin, also übereinstimmend mit Normalsera. Aus diesen Versuchen zu beurteilen, scheint es also, als ob die bei der Diastasewirkung interessierenden Lipoiden sich im Syphilisserum nicht besonders vom Normalserum verschieden verhalten. Doch lassen die wenigen Versuche keine bestimmten Urteile zu.

Die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure.

Von

Emil Starkenstein.

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 17. November 1910.)

I.

Chemie der Inositphosphorsäure.

Die Existenz eines phosphorhaltigen Pflanzenbestandteiles, der bei der Spaltung Inosit liefert, war bereits seit langem bekannt und vielfach beschrieben worden, ehe es gelang, diesen Körper als ein chemisches Individuum zu charakterisieren, sowie seine Eigenschaften und physiologische Bedeutung für das Pflanzen- und Tierreich kennen zu lernen.

Im Jahre 1872 hat Pfeffer[1]) charakteristische, konstant vorkommende Einschlüsse der Aleuronkörner, Globoide, beschrieben, die wohl mit der später als Inositphosphorsäure erkannten Verbindung identisch zu sein scheinen. Ferner beschrieben derartige Pflanzenstoffe E. Schulze und E. Winterstein[2])[3]) sowie E. Winterstein[4]).

Die Reindarstellung der genannten Verbindung war erst Posternak[5–9]) gelungen. Dieser stellte aus den Samen zahl-

[1]) Pfeffer, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 8, 465, 1872.

[2]) E. Schulze und E. Winterstein, Über einen phosphorhaltigen Bestandteil der Pflanzensamen. Zeitschr. f. phys. Chem. 22, 90.

[3]) E. Schulze und E. Winterstein, Ein Nachtrag zur Abhandlung: Über einen phosphorhaltigen Bestandteil der Pflanzensamen. Zeitschr. f. phys. Ch. 40, 120.

[4]) E. Winterstein, Über einen phosphorhaltigen Pflanzenbestandteil, welcher bei der Spaltung Inosit liefert. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 2299.

[5]) M. Sw. Posternak, Über das erste Organisationsprodukt der Phosphorsäure in den Chlorophyllpflanzen. Revue générale de Botanique 12, 5, 1900.

[6]) M. Sw. Posternak, Sur la matière phospho-organique de réserve des plantes à chlorophylle. Procédé de préparation. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 137, 202, 1903.

reicher Pflanzen eine Verbindung dar, die 26,05% organisch gebundenen Phosphor enthält und nahezu 90% des gesamten Phosphorgehaltes der Pflanze beträgt. Dieser Körper erhielt den Namen „Phytin"; er wird im großen von der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel dargestellt und in Form des Calcium-Magnesium-Doppelsalzes in den Handel gebracht.

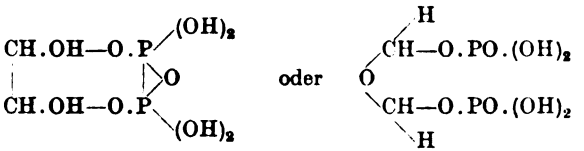
Die chemischen Eigenschaften dieses Körpers wurden ebenfalls von Posternak eingehend studiert.[7] [8]) Die freie Säure stellt einen in destilliertem Wasser vollkommen, in absolutem Alkohol weniger gut, in Äther, Benzin, Chloroform und Eisessig absolut unlöslichen Körper dar. Von weiteren Eigenschaften gibt Posternak an: die Fällbarkeit mit Eisenchlorid, mit Silbernitrat (weißer Niederschlag). Uran fällt die Säure wie die anorganischen Phosphate, Magnesium, Barium, Strontium geben damit amorphe Niederschläge. Von den Salzen der Inositphosphorsäure erwähnt Posternak ein Calcium-Magnesium- sowie ein Calcium-Natrium-Doppelsalz, das mit 8 Molekülen Wasser in weichen, seidenartigen, sich zu Büscheln vereinigenden Nadeln krystallisiert. Mit Molybdän-Salpetersäure reagiert der Körper nicht.

Die Elementaranalyse führte den genannten Autor zur Aufstellung der Summenformel:

$$C_6H_8P_2O_9.$$

Inositphosphorsäure ist gegen Alkalien selbst beim Kochen beständig, durch Mineralsäuren wird sie in der Hitze quantitativ in Phosphorsäure und Inosit gespalten.

Auf Grund dieser Eigenschaften stellt Posternak für die Inositphosphorsäure folgende Konstitutionsformel auf:



Die Bildung von Inosit und Phosphorsäure aus dem genannten Moleküle verläuft nach Posternak in zwei Phasen: es kommt erst unter Wasseraufnahme zur Bildung von Formaldehyd:

$$C_6H_8P_2O_9 + H_2O = 2H_3PO_4 + 2CH_2O.$$

---

[7]) M. Sw. Posternak, Sur les propriétés et la composition chimique de la matière phospho-organique de réserve des plantes à chlorophylle. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 137, 337, 1903.

[8]) M. Sw. Posternak, Sur la constitution de l'acide phospho-organique de réserve de plantes vertes et sur le premier produit de reduction du gaz carbonique dans l'acte de l'assimilation chlorophyllienne. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 137, 439, 1903.

[9]) M. Sw. Posternak, Sur un nouveau principe phospho-organique d'origine végétale, la Phytine. Compt. rend. Soc. Biol. 55, 1190, 1903.

Durch Kondensation von 6 Molekülen Formaldehyd soll dann Bildung von Inosit erfolgen:

$$6\,CH_2O = C_6H_{12}O_6.$$

Die oben aufgestellte Konstitutionsformel entspricht der einer Anhydro-oxymethylendiphosphorsäure; es würde somit jedes Molekül derselben zur Bildung des Inosits zwei CH.OH-Gruppen beitragen:

$$3\,C_2H_8P_2O_9 + 3\,H_2O = (CHOH)_6 + 6\,H_3PO_4.$$

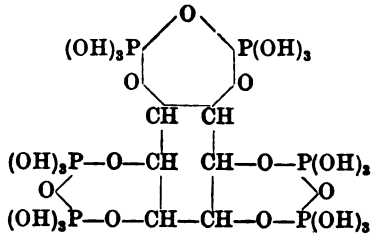
Gegen die Richtigkeit der von Posternak aufgestellten Konstitutionsformel hat nun zuerst Neuberg[1][2]) gewichtige Bedenken erhoben.

Neuberg war es gelungen, aus dem Phytin durch direkte Destillation des Präparates Furfurol zu gewinnen. Diese Beobachtung berechtigte ihn, auf Grund früherer Erfahrungen[3]) anzunehmen, daß im Phytin der Inositring vorgebildet ist. Seine Annahme wurde noch unterstützt durch die Befunde von Suzuki, Yoshimura und Takaishi[4]). Diese Autoren fanden ein phytinspaltendes Ferment, das sie als Phytase bezeichnen. Es vermag Phytin direkt in Phosphorsäure und Inosit zu zerlegen.

Die leicht ausführbare Hydrolyse des Phytins durch Säuren (nahezu quantitative Spaltung innerhalb 10 Minuten) sowie die Zerlegung durch Fermente machen es — wie Neuberg betont — unwahrscheinlich, daß der Inositbildung im Phytin ein so komplizierter Vorgang zugrunde liegt, wie es Posternak annimmt.

Zu demselben Schlusse kam auch Winterstein[5]), der selbst durch Alkalien bei Anwendung hohen Druckes und bei anhaltendem Erhitzen von dem Phytinmoleküle Inosit abspalten konnte.

Die mitgeteilten Beobachtungen führten nun Neuberg zu dem Schlusse, daß der Inosit im Phytinmoleküle vorgebildet und an Phosphorsäure gepaart ist, vielleicht folgender Konstitution entsprechend:



[1]) Neuberg und Brahn, Über die Inosinsäure. Diese Zeitschr. 5, 443, 1907.

[2]) Neuberg, Zur Frage der Konstitution des Phytins. Diese Zeitschr. 9, 560, 1908.

[3]) Neuberg, Beziehungen des cyclischen Inosits zu den aliphatischen Zuckern. Diese Zeitschr. 9, 551, 1908.

Für meine Versuche benutzte ich vorerst das käufliche Phytin. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß dieses Präparat nicht analysenrein und in dieser Form für quantitative Versuche auch nicht geeignet ist. Vor allem enthielten diese Präparate relativ viel anorganische Phosphate. Auch Kohlenhydrate finden sich bisweilen beigemengt (Neuberg[6]). Da anzunehmen ist, daß das Phytin als reine organische Phosphorsäureverbindung zum Versand kommt, so liegt die Vermutung nahe, daß das Präparat leicht von selbst, ohne tiefere Eingriffe, in seine Bestandteile: Inosit und Phosphorsäure zerfällt. Diese Vermutung stützt sich zunächst auf die Beobachtung, daß das käufliche Phytin neben freier anorganischer Phosphorsäure auch freien Inosit enthält. Bestätigend für diese Annahme aber sind die Zahlen, die eine Bestimmung der Mineralphosphate vor und nach dem Trocknen der Substanz bei 100° ergeben hat.

Methodisch sei hier erwähnt, daß von mir als anorganische Phosphate die mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung fällbaren bezeichnet werden, gegenüber der Bestimmung der Gesamtphosphate durch Titration mit Uranylacetat; doch ist zu beachten, daß die Zahl der durch Urantitration bestimmten Phosphate nicht den vorhandenen Gesamtphosphaten entspricht, sondern zu wenig anzeigt. Auf die Methodik der fehlerfreien quantitativen Bestimmung organischer Phosphorsäure wollen wir später ausführlich eingehen.

I. 0,9743 g käuflichen Phytins enthalten:
durch Molybdän-Salpetersäure fällbare P_2O_5: 0,0331 g
= 19,1 % der durch Urantitration bestimmten P_2O_5
= 0,1732 g.

II. 0,9931 g käuflichen Phytins werden bei 100° getrocknet. Nach dem Trocknen = 0,8818 g.

---

[4]) Suzuki, Yoshimura, Takaishi, Über ein Enzym, Phytase, das Anhydrooxymethylendiphosphorsäure spaltet. Bull. of the College of Agriculture, Tokyo, Imper. University, 7, 503. Zit. nach Maly J. T., 37, 880.

[5]) E. Winterstein, Ein Beitrag zur Frage der Konstitution des Phytins. Zeitschr. f. phys. Chem. 58, 118, 1908.

[6]) Neuberg, Beziehungen des cyclischen Inosits zu den aliphatischen Zuckern. Diese Zeitschr. 9, 551, 1908.

Durch Molybdän-Salpetersäure fällbare P_2O_5: 0,1019 g = 57% der durch Urantitration bestimmten P_2O_5 = 0,1786 g.

Wir sehen also, daß das bloße Trocknen des Phytins bei 100° den Zerfall des größten Teiles der Substanz zur Folge hat.

Diese Beobachtung dürfte ein weiteres unterstützendes Moment sein für die Annahme Neubergs und Wintersteins, daß im Phytin der Inositring bereits vorgebildet ist; denn mit der Zunahme der anorganischen Phosphate im getrockneten Präparat geht auch die Menge des freien, wasserlöslichen Inosits gleichmäßig in die Höhe. Das Trocknen der Substanz bei 100° ist aber gewiß ein noch viel geringerer Eingriff als Säurehydrolyse und Fermentspaltung und muß die Möglichkeit einer Kondensation des Formaldehyds zu Inosit vollkommen ausschließen.

Da es sich bei den folgenden Versuchen darum handelte, mit einem reinen Präparat zu arbeiten, so mußte stets erst eine Isolierung der organischen Phosphorsäureverbindung von den abgespaltenen anorganischen Phosphaten vorgenommen werden. Dies ist durch Umfällen des Präparates mit konzentrierter Essigsäure zu erreichen.

Da aber auch der freie Inosit in Eisessig unlöslich ist, mußte vor der Essigsäurefällung eine Bleifällung eingeschaltet werden.

Sowohl Inosit als Inositphosphorsäure geben Bleiverbindungen, von denen aber die Inositbleiverbindung in Essigsäure löslich ist. Es wurde daher stets das käufliche Phytin in verdünnter Essigsäure gelöst und mit Bleizucker gefällt. Der Niederschlag wurde mit verdünnter Essigsäure gewaschen, dann in möglichst wenig Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat mit Eisessig und Calciumacetat bis zur beginnenden Fällung versetzt.

Da es sich stets nur darum handelte, ein reines Präparat zu erhalten, und nicht so sehr auf eine quantitative Ausbeute geachtet wurde, wurde von einem Nachwaschen des H_2S-Niederschlages abgesehen, um nicht das Filtrat für die nachfolgende Fällung mit Eisessig zu sehr zu verdünnen.

Das auf diese Weise gereinigte Präparat wurde im Exsiccatar über Kalihydrat zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Weiter machte sich für die Versuche die Notwendigkeit einer quantitativen Bestimmung der Inositphosphorsäure geltend.

Die Fällung der Filtrate der durch H_2S zersetzten Bleiniederschläge mit Eisessig, die wohl zu den reinsten Präparaten führen würde, ist nicht zu verwenden, da die Fällung der

Substanz aus stark verdünnten Lösungen, mit denen stets zu rechnen war, nicht quantitativ erfolgt.

Es konnte daran gedacht werden, die Trennung der Substanz von den anorganischen Phosphaten durch eine der üblichen Phosphorsäurebestimmungsmethoden vorzunehmen. Es sind dies: die Bestimmung der Phosphorsäure mit ammoniakalischer Magnesiamixtur und Wägung als pyrophosphorsaure Magnesia, oder dieser Methode vorangehend die Fällung mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung; schließlich, häufig verwendet, die Bestimmung der Phosphate durch Titration mit Uranacetat unter Verwendung von Cochenilletinktur oder Ferrocyankalium als Indicator.

Eine Durchsicht der meisten Arbeiten, in denen es sich darum handelte, anorganische Phosphate von organischen zu trennen, hatte ergeben, daß die Differenz zwischen den Phosphatwerten vor und nach der Veraschung, mit einer der angeführten Methoden erhoben, als organische Phosphorsäure angegeben wird.

Die Unzulässigkeit dieser Bestimmungsart für alle Fälle ergibt sich schon daraus, daß eine der wichtigsten organischen Phosphorsäuren, die Nucleinsäure, bei Anwendung von molybdänsaurem Ammon—Salpetersäure fällt und daher mit der anorganischen mitbestimmt werden könnte. Wenn dies ein Moment ist, das praktisch kaum von Bedeutung ist, so haben meine folgenden Untersuchungen ergeben, daß die Inositphosphorsäure eine häufig vorkommende Verbindung darstellt, deren besonderes analytisches Verhalten für jede der genannten Bestimmungsmethoden erst festzustellen war.

Für die Fällbarkeit einer Phosphorsäureverbindung mit Uranacetat, Magnesiamixtur oder molybdänsaurem Ammon—Salpetersäure kommt in erster Linie in Betracht, wieviel freie OH- bzw. H-Valenzen dem betreffenden Fällungsmittel zur Verfügung stehen.

Die bisher vorwiegend in Untersuchung gezogene organische Phosphorsäureverbindung, Glycerinphosphorsäure, hat folgenden konstitutiven Aufbau:

$$CH_2OH—CHOH—CH_2O—PO(OH)_2.$$

Wir sehen hier zwei freie OH-Gruppen und finden es erklärlich, daß die Verbindung ein Ca-Salz gibt. Auch eine Mg-Verbindung ist möglich, nicht aber die Bildung von Tripel-

phosphat, da für den Eintritt des Ammoniakmoleküls keine freie Valenz vorhanden ist.

Nach der Formel muß auch der Eintritt von UO_2 in das Phosphorsäuremolekül möglich sein. Titriert man Glycerinphosphorsäure mit Uranacetat, so findet man, daß tatsächlich eine Bindung von Uran erfolgt. Daß dabei keine unlösliche Verbindung entsteht, dürfte durch die Gegenwart des Glycerinrestes bedingt sein. Es ist dies eine Beobachtung, die bei der Urantitration, speziell in Harnen, in denen nach Glycerinphosphorsäure gesucht wird, berücksichtigt werden muß.

Die Nichtfällbarkeit der Glycerinphosphorsäure als Magnesiumammoniumverbindung dürfte der Anlaß gewesen sein, daß man alle durch Magnesiamixtur, Uran oder Ammoniummolybdat—Salpetersäure fällbaren Phosphate als anorganische bezeichnete, die nach der Veraschung des Filtrats bestimmten, als organische.

Daß dies hinsichtlich der Urantitration auch für die Glycerinphosphorsäure unrichtig ist, haben wir eben gesehen. Durchaus unanwendbar aber ist die Methode für die Bestimmung der Inositphosphorsäure.

Inositphosphorsäure zeigt den genannten Reagenzien gegenüber ein ganz anderes Verhalten:

Das käufliche Phytin stellt das sauere Calcium-Magnesiumsalz der Inositphosphorsäure dar. Dieses ist, wie erwähnt, mit anorganischen Phosphaten und freiem Inosit vermengt. Aus seiner essigsauren Lösung gelingt es durch Bleizucker die anorganischen und organisch gebundenen Phosphate auszufällen. Wenn man den Niederschlag so lange wäscht, bis das Waschwasser nicht mehr mit Ammoniumoxalat reagiert, dann den Bleiniederschlag mit H_2S zersetzt und filtriert, so erhält man eine Lösung, die frei von Ca und Mg ist und nur die anorganischen und organischen Phosphate enthält. Durch Zusatz von Calciumacetat und Eisessig in genügender Menge kann man das inositphosphorsaure Calcium ausfällen, das dann mit Eisessig gewaschen werden muß. Durch neuerliche Bleifällung und Zersetzung des Niederschlags gelangt man schließlich zu einer Lösung, die nur reine Inositphosphorsäure enthält.

Die Untersuchung derselben hatte nun ergeben, daß diese, ebenso wie ihr Ca-Salz, durch molybdänsaures Ammon in sal-

petersaurer Lösung nicht gefällt werden kann, daß sie aber mit Uran und Magnesium unlösliche Verbindungen eingeht.

Dieses Reaktionsvermögen läßt vermuten, daß die Phosphorsäure in unserer Verbindung in zweibasischer Form vorhanden ist.

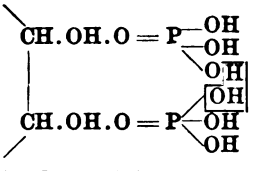
Wir gehen nun bei unseren Betrachtungen von der empirischen Formel Posternaks bzw. Neubergs aus. Dieselbe ist $C_6H_{24}P_6O_{27}$. Da bei der Hydrolyse der Verbindung $C_6H_{12}O_6 + 6H_3PO_4$ ensteht, so muß notwendigerweise $3H_2O$ eintreten, i. e. es muß bei der Bildung von Inositphosphorsäure zum Austritt von $3H_2O$ gekommen sein.

Dies ist nun in der Weise möglich, daß beim Zusammentreten je einer der 6 vorhandenen CHOH-Gruppen des Inosits und einer der 6 $(OH)_2PO$ ein H_2O, austritt. Würde diese Reaktion 6mal erfolgen, müßten auch $6H_2O$ austreten, was aber der empirischen Formel nicht entspricht.

Nun haben wir bereits gesehen, daß die Inositphosphorsäure beim bloßen Trocknen in Inosit und Phosphorsäure zerfällt.

Dies alles läßt die Vermutung aufkommen, daß wir hier keinen Inositphosphorsäureester vor uns haben, sondern eine komplexe Verbindung.

Es würde so an jede CH.OH-Gruppe des Inosits je eine Phosphorsäure herantreten und zwischen je 2 Phosphorsäuren erfolgt der Austritt von H_2O.



Es käme auf diese Weise zur Bildung von Pyrophosphorsäure.

Für das Bestehen einer Verbindung von obiger Annahme sind nun auch eine Reihe von Anhaltspunkten gegeben:

Vor allem wird es erklärlich, daß die Verbindung mit Pb, UO_2, Mg, Ca usw. Salze bildet und daß anderseits die Bildung eines Molybdänsalzes unmöglich ist. Die Verbindung von molybdänsaurem Ammon und Phosphorsäure entspricht der Formel:

$$\begin{matrix} NH_4 \\ NH_4 \\ NH_4 \end{matrix}\!\!>\!PO_4 + 12\,MoO_3 + 6\,H_2O.$$

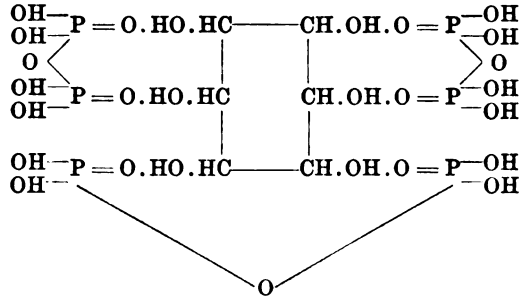
Da aber im Molekül der Inositphosphorsäure nach unseren Erfahrungen nur 2 OH-Gruppen jeder Phosphorsäure zur Verfügung stehen, so ist die Bildung obiger Verbindung unmöglich.

Auch bei Zusatz von ammoniakalischer Magnesiamixtur zur Lösung der Inositphosphorsäure entsteht nicht das Ammonium-Magnesiumphosphat, sondern nur das schwer lösliche Mg-Salz.

Ferner gibt die Inositphosphorsäure mit Ag eine weiße Verbindung, eine Reaktion, die wohl der Pyrophosphorsäure, nicht aber der Orthophosphorsäure zukommt.

Die Unbeständigkeit der Verbindung beim Kochen mit Säuren, bei längerem Liegen und beim Trocknen macht ebenfalls das Vorhandensein von Pyrophosphorsäure wahrscheinlich. Beim Trocknen, Hydrolysieren usw. kommt es eben zur Bildung von Orthophosphorsäure und zur Spaltung der komplexen Verbindung, und damit wird die Phosphorsäure auch durch Molybdän nachweisbar.

Die Vermutung, daß das Phytin von einer kondensierten H_3PO_4 abstammt, hat schon Neuberg (l. c. auf S. 58) geäußert. Auf Grund meiner jetzigen Erfahrungen dürfte der Inositphosphorsäure vielleicht folgende Konstitutionsformel zukommen:



Aus obigen analytischen Versuchen ergibt sich weiter, daß wir im Phytinmoleküle nur Inosit und Phosphorsäure vor uns haben, nicht aber noch Glucuronsäure, wie dies Levene[1]) behauptete. Wie bereits erwähnt, enthält das käufliche Phytin gelegentlich Kohlenhydrate, und ich fand auch bei solchen Präparaten die Orcinreaktion wohl positiv, niemals jedoch zeigte die nach obigem Verfahren gereinigte Inositphosphorsäure auch nur Spuren der Orcinreaktion, so daß die Annahme Neubergs[2]), Levene hätte ein unreines Präparat analysiert, gewiß den Tatsachen entspricht.

[1]) Levene, Über die gepaarten Phosphorsäuren in Pflanzensamen. Diese Zeitschr. 16, 399, 1909.

[2]) Neuberg, Notiz über Phytin. Diese Zeitschr. 16, 406, 1909.

Nun ist noch die Art der Salzbildung der Inositphosphorsäure von besonderer Wichtigkeit.

Bekannt sind: ein saures Calcium-Magnesiumdoppelsalz, ferner ein saures Calciumsalz, dann das Calcium-Natriumdoppelsalz, schließlich die neutralen Salze von Calcium und Magnesium.

Das eben angeführte Formelbild läßt die Bildung aller dieser Salze möglich erscheinen. Von allen diesen kommen für uns aber besonders die Uran-, die saure Calcium- und die saure Calcium-Magnesiumverbindung in Betracht, die uns auch für die Art der Salzbildung die meisten Anhaltspunkte bieten.

Die genannten Salze lassen es mit Rücksicht auf ihre Zusammensetzung wahrscheinlich erscheinen, daß nur eine OH-Gruppe eines jeden Phosphorsäuremoleküls besonders reaktionsfähig ist.

Hierüber gibt vor allem die Urantitration Aufschluß; denn diese gibt, wie aus folgenden Beispielen hervorgeht, nur den halben Wert der tatsächlich vorhandenen Phosphorsäure an.

In einer essigsauren Lösung von Inositphosphorsaurem Calcium wurde der Gehalt von Phosphorsäure durch Urantitration bestimmt:

$$5 \text{ ccm} = 0{,}0199 \text{ g } P_2O_5$$

Nun wurden 20 ccm obiger Lösung nach Neumann durch das Säuregemisch (Acid. sulfuric. conc. Acid. nitric. conc. āā) verascht, die Schwefelsäure verdünnt und nach Zusatz genügender Mengen von Ammonnitrat die Phosphate mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung gefällt. Der gewaschene Niederschlag wurde in Ammoniak gelöst, mit Magnesiamixtur umgefällt, dieser nach dem Waschen wieder in 20 ccm verdünnter Essigsäure gelöst, und schließlich mit Uranacetat titriert.

$$5 \text{ ccm} = 0{,}0405 \text{ g } P_2O_5.$$

Aus einer großen Zahl anderer Versuche seien angeführt:

A. 5 ccm einer Lösung von Inositphosphorsäure durch Uran titriert: 0,0224 g P_2O_5.

B. 5 ccm derselben Lösung nach der Veraschung: 0,0458 g P_2O_5.

Oder:

A. 0,0148 g P_2O_5.

B. 0,0275 g P_2O_5.

Aus diesen angeführten Beispielen geht hervor, daß die Urantitration der Inositphorsäure nur den halben Wert der wirklich vorhandenen Phosphorsäure angibt.

Auf Grund dieser Beobachtung muß notwendigerweise angenommen werden, daß ein UO_2 je ein H zweier Phosphorsäuremoleküle ersetzt, daß also nur eine OH-Gruppe von den zwei freien eines jeden Phosphorsäuremoleküls reaktionsfähig erscheint.

Dies geht auch aus der Beschaffenheit der Ca- und Mg-Salze hervor. Die Existenz einer sauren Ca- und Ca-Mg-Verbindung beweist, daß außer den besetzten H-Valenzen auch noch freie übrig sein müssen.

Für das saure Ca-Mg-Salz der Inositphosphorsäure berechnete Posternak den Gehalt an P zu 22,8%, was einer Verbindung von der Zusammensetzung: $C_6H_{18}P_6O_{27}Ca_2Mg$ entspricht.

Die Analyse des P und Ca im sauren Ca-Salze ergab, daß auf 6 Phosphorsäuren nur 3 Ca kommen. Es erscheinen also auch bei allen diesen Salzen nur 6 H-Valenzen der vorhandenen 12 durch das Ca- und Ca-Mg besetzt.[1])

Bloß in dem von Posternak analysierten Kalk-Natriumdoppelsalz sind 4 Valenzen durch 2 Ca und die übrigen 8 durch das einwertige Na-Ion besetzt. In keinem Falle aber erscheinen mehr als 12 besetzbare OH-Gruppen, was für die oben angeführte Konstitutionsformel spricht.

Aus dem bisher Mitgeteilten geht bereits hervor, daß bei Vorhandensein von Inositphosphorsäure im Harne die Anwendung der Uran- oder Magnesiafällung zur Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure einen Fehler bedeuten muß, da die genannte organische Verbindung eben schon in der anorganischen Fraktion mitbestimmt wird.

Besonders zu berücksichtigen ist die Fällung mit ammoniakalischer Magnesiamixtur. Auf Grund der mitgeteilten Erfahrungen sehen wir, daß neben dem Ca noch Mg in das Molekül der Inositphosphorsäure eintreten kann, bzw. Mg allein. Es entsteht dann das Calcium-Magnesiumdoppelsalz, bzw. das Mg-Salz, dieser Verbindung, nicht aber das Ammonium-Magnesiumphosphat. Während dieses letztere in Wasser unlöslich ist, ist das Ca-Mg-Doppelsalz wohl schwer löslich, nicht aber unlöslich, und wir werden daher stets zu berücksichtigen haben, daß wir es hier mit keiner quantitativen Fällung zu tun haben.

Darauf wollen wir später bei Besprechung der biologischen Bedeutung der Inositphosphorsäure noch zurückkommen.

Unter den sonst für die Methodik der Bestimmung orga-

[1]) Inositphosphorsäure bildet mehrere Arten von sauren Ca-Salzen, sowie neutrale Ca-Verbindungen. Über die Bedingungen für das Zustandekommen derselben, sowie über deren genaue Analysen sollen weitere Versuche Aufschluß geben.

nischer Phosphorsäuren in Frage kommenden gepaarten Phosphorsäureverbindungen erregen besonders die in letzter Zeit von Neuberg und seinen Mitarbeitern[1-4]) dargestellten Phosphorsäureester von Kohlenhydraten unsere besondere Aufmerksamkeit.

Weder Saccharosephosphorsäure noch Glucosephosphorsäure geben eine unlösliche Verbindung mit molybdänsaurem Ammon oder Magnesiamixtur; dagegen gibt phosphoryliertes Lactalbumin mit Uranacetat eine Fällung, die das Salz einer organischen Phosphorsäureverbindung darstellt.

Im letztgenannten Falle haben wir also etwas ähnliches vor uns, wie bei der Inositphosphorsäure.

Die Beachtung aller Möglichkeiten, mit Uran, Magnesium oder Ammoniummolybdat unlösliche, bzw. lösliche Verbindungen zu erhalten, dürfte auch bei anderen Phosphorsäureverbindungen von Wichtigkeit sein; es werden dadurch analytische Fehler vermieden werden, anderseits können vielleicht auch Anhaltspunkte gewonnen werden für die Konstitution derartiger organischer Verbindungen.

II.

Inositphosphorsäure als Quelle des freien Inosits im pflanzlichen und tierischen Organismus.

Die Identität der empirischen Formel des Traubenzuckers und Inosits war Anlaß für die Zuteilung dieses Körpers zu den Kohlenhydraten, und die Entdeckung desselben im Harne der Diabetiker unterstützte diese Auffassung. Andererseits bedingte dies, auch in physiologisch-chemischer Beziehung, einen Zusammenhang zwischen Glucosurie und der sogenannten Inosiurie zu vermuten und letztere als eine Stoffwechselstörung unbekannter Art anzusehen. Selbst die Arbeiten Maquennes[5]), der die Konstitution des Inosits als die eines Hexahydrohexaoxy-

[1]) Neuberg und Pollak, Über Kohlenhydratphosphorsäureester I. Über Saccharosephosphorsäure. Diese Zeitschr. 23, 515, 1910.

[2]) Neuberg und Pollak, Über Kohlenhydratphosphorsäureester II. Über Saccharoseschwefelsäure und die Phosphorylierung von Eiweiß. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, Heft 11, 1910.

[3]) Neuberg und Pollak, Über Phosphorsäure- und Schwefelsäureester von Kohlenhydraten. Diese Zeitschr. 26, 514, 1910.

[4]) Neuberg und Pollak, Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen. Diese Zeitschr. 26, 529, 1910.

[5]) Maquenne, Compt. rend. de l'Acad. d. Soc. 104, 225.

benzols feststellte, vermochten nichts daran zu ändern, daß der Inosit sowohl in rein chemischen als in physiologisch chemischen Lehrbüchern stets bei den Kohlenhydraten abgehandelt wurde, trotzdem eigentlich keine andere Beziehung zu diesen bestand als die Summenformel und der süße Geschmack.

Erst Neuberg[1]) war es gelungen, aus Inosit Furfurol zu gewinnen, und damit war eigentlich zum ersten Male eine innere Beziehung zwischen Inosit und Kohlenhydraten nachgewiesen.

Das reichliche Vorhandensein von Inosit in der grünen Pflanze hat dazu geführt, auch die Bayersche Hypothese der Zuckerbildung auf die Entstehung von Inosit zu übertragen.

Obwohl die physiologisch-chemischen Untersuchungen über den Inosit nicht den geringsten Zusammenhang zwischen diesem und den Kohlenhydraten feststellen konnten, so ist doch — namentlich mit Rücksicht auf den interessanten Befund Neubergs — die Möglickkeit zu Recht bestehend, daß wir im Inosit jenen Körper vor uns haben, der als ein Übergangsglied von der aliphatischen Reihe zu den cyclischen Kohlenstoffverbindungen gelten kann.

Die Entdeckung des Phytins als eine Substanz, die bei der Hydrolyse mit Mineralsäuren Inosit gibt, ermöglichte die leichtere Darstellung dieses Körpers. Da der aus Phytin dargestellte Inosit durch das Entgegenkommen der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel für Untersuchungszwecke zur Verfügung gestellt wurde, war es ermöglicht, diesen, in vielfacher Beziehung so interessanten Körper, auch in physiologisch-chemischer Beziehung genauer zu studieren.

In erster Linie galten diese neueren Untersuchungen den Fragen nach der physiologischen Bedeutung des Inosits sowie seinem Schicksale im Tierkörper [Paul Mayer[2])[3]), Starkenstein[4])]. Andererseits aber gaben sie Anregung für eine Reihe neuer Fragestellungen in der Inositfrage.

Als Resultat der Untersuchungen hatte sich einerseits in Bestätigung eines Befundes Hoppe-Seylers ergeben, daß Inosit, wenn auch nur in Spuren, so doch in jedem normalen Harne vorkomme, somit als normaler Harnbestandteil angesehen werden kann. Dementsprechend

[1]) Neuberg, Beziehungen des cyclischen Inosits zu den aliphatischen Zuckern. Diese Zeitschr. 9, 551, 1908.

[2]) Paul Mayer, Über die physiologische Bedeutung des Inosits. Diese Zeitschr. 2, 392, 1906.

[3]) Paul Mayer, Über das physiologische Verhalten von Inosit. Diese Zeitschr. 9, 533, 1908.

[4]) E. Starkenstein, Über Inositurie. Sitzungsber. d. biol. Sektion d. Lotos, 56, Mai 1908.

kann auch die vermehrte Ausscheidung des Inosits durch den Harn als keine spezielle Stoffwechselstörung bezeichnet werden. Inositurie ist durch jede Art von gesteigerter Diurese zu erreichen und ist auch beim Diabetes mellitus ebenso wie beim Diabetes insipidus eine durch vermehrte Wasserausscheidung vermehrte Ausschwemmung des Inosits der Gewebe (Starkenstein[1]). Der Inosit wird vom Körper nur in geringen Mengen zerstört und erscheint nach subcutaner und intravenöser Injektion zu 50 bis 60% im Harn wieder (Paul Mayer, Starkenstein). Ob der fehlende Teil der Oxydation anheimfällt oder erst in den Geweben retiniert wird und von hier aus allmählich zur Ausscheidung gelangt, ist noch nicht sicher festgestellt.

Bei Verfütterung der Substanz per os erscheinen nur geringe Bruchteile im Harne wieder; doch ist aus derartigen Versuchen kein Schluß auf eine Oxydation dieses Körpers zu ziehen, da Inosit vom Bacterium coli zerstört wird.

Ein Teil des Inosits dürfte wohl auch im Körper auf fermentativem Wege abgebaut werden. Auf Grund qualitativer Reaktionen konnte ich in früheren Versuchen Milchsäure als Abbauprodukt nachweisen. Paul Mayer[2]) ist es gelungen, durch Darstellung des Zinklactats den Übergang von Inosit in Gärungsmilchsäure im Körper nachzuweisen, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit Inosit neben anderen Substanzen als Quelle für die Milchsäurebildung im Körper angesehen werden kann.

Als eines der wichtigsten Resultate meiner früheren Untersuchungen über den Inosit hatte sich ergeben,[1])[3]) daß die Organe wachsender Individuen, also vor allem die der Neugeborenen, absolut und relativ reichlichere Mengen dieses Körpers enthalten als bereits ausgewachsene. Ich konnte in den Gehirnen von 8 jungen Kaninchen eines Wurfes (20 Stunden alt) in 0,85 g Trockensubstanz 0,0612 g Inosit = 7,2% nachweisen, im Gehirn des Muttertieres dagegen in 2,6 g Trockensubstanz nur 0,3%. Im Gehirn eines neugeborenen Kalbes fand ich in 278 g frischer Substanz 0,5663 g = 0,2%, im Gehirn eines alten Stieres dagegen in 407 g frischer Substanz nur 0,3299 g = 0,081% Inosit.

Es scheint dem Inosit beim Wachstum der tierischen Zelle ebenso wie beim Wachstum der pflanzlichen (Meillère[4]) eine besonders wichtige Rolle zuzukommen.

---

[1]) Siehe Fußnote 4 auf S. 68.

[2]) Siehe Fußnote 3 auf S. 68.

[3]) E. Starkenstein, Über Inositurie und die physiologische Bedeutung des Inosits. Zeitschr. f. experim. Pathol. und Ther. 5, 1908.

[4]) Meillère, Contribution à l'étude biochimique de l'inosite. L'inosite dans le Règne végétal. Compt. rend. Soc. Biol. 1907, 286.

Zu gleichen Schlüssen für die Bedeutung des Inosits beim Wachstum kam auch Rosenberger[1]) auf Grund seiner Untersuchungen.

Während nun das Vorhandensein freien Inosits in den Geweben des Körpers, sowie in zahlreichen Körperflüssigkeiten, Nahrungsmitteln usw. als erwiesen galt, kam Rosenberger[1])[2]) zu dem Resultate, daß der lebende Organismus überhaupt keinen Inosit enthalte, sondern nur eine Vorstufe desselben, die er als Inositogen bezeichnet und aus der sich erst nach dem Tode Inosit bilden soll.

Obwohl ich auf Grund neuerlicher Untersuchungen[3]) zweifellos freien Inosit im lebenden Organismus nachweisen konnte, war doch die Möglickeit nicht von der Hand zu weisen, daß der Körper auch gebundenen Inosit enthalte, der durch verschiedene fermentative Prozesse abgespalten werden könnte. In dieser Hinsicht äußerte ich bereits früher die Vermutung,[3]) daß auch im Tierkörper wie in der Pflanze eine Verbindung des Inosits mit der Phosphorsäure bestehen könnte.

Unterstützend für die Annahme einer Beziehung zwischen Inosit und Phosphorsäure im Tierkörper war vor allem die Existenz einer Inositphosphorsäureverbindung in den Pflanzen, dann aber die oben mitgeteilten Beobachtungen, daß wachsende Organe reichlichere Mengen von Inosit enthalten, als bereits ausgewachsene.

Der Nachweis einer Inositphosphorsäure im Tierreich würde diese Erscheinung vollauf erklären: bei der Bedeutung der Phosphorsäuren für das Knochenwachstum könnte auch diese organische Phosphorsäure eine Rolle spielen.

Über die Quellen des Inosits im Tierkörper ist fast gar nichts bekannt, speziell nichts über eine selbstständige Bildung von Inosit im Körper. Der Inosit wurde wohl zuerst im Herzmuskel entdeckt, doch nachher in unverhältnismäßig größeren Mengen im Pflanzenreiche und

---

[1]) F. Rosenberger, Die Beziehung der Zyklosen zum tierischen Organismus. Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 34.

[2]) F. Rosenberger, Ein Verfahren zum Nachweis von Inosit in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. Zeitschr. f. phys. Chem. 56, 373, 1908.

[3]) E. Starkenstein, Die Beziehungen der Zyklosen zum tierischen Organismus. Zeitschr. f. phys. Chem. 58. 162, 1908.

in den aus Pflanzen dargestellten Nahrungsmitteln (Brot, Bier, Wein usw.) gefunden. Es war also sehr naheliegend, anzunehmen, daß der Inosit mit der Nahrung aufgenommen wird.

Die Annahme, daß der Nahrungsinosit die Quelle für den Körperinosit darstellt, bedeutet hinsichtlich der Frage nach der Entstehung des Inosits nur eine Verschiebung aus dem Tierreiche ins Pflanzenreich. Es besteht dann weiter die Möglichkeit, daß der Inosit in der Pflanze aus einer Muttersubstanz gebildet wird und daß vielleicht auch eine derartige Vorstufe mit der Nahrung aufgenommen wird; aus solchen Muttersubstanzen könnte dann auch erst im Körper der Inosit gebildet werden.

In einer Dissertation „Über Vorkommen und Herkunft des Inosits im Tierkörper" diskutiere jüngst Klein[1]) die eben mitgeteilten Möglichkeiten, ohne allerdings für die eine oder andere irgend ein durch ein Experiment begründetes unterstützendes Moment anführen zu können.

Als Muttersubstanzen des Inosits wurden eine Reihe von Substanzen angesprochen; doch ist es wahrscheinlich, daß es sich in den meisten Fällen um die Inositphosphorsäure Wintersteins und Posternaks handeln dürfte, sowie ja auch die verschiedenen in der Pflanze gefundenen „Zucker" die Dambose, der Phasaeomannit usw. als Inosit identifiziert wurden.

Im Jahre 1880 berichtete Danilewski[2]) über die Entdeckung eines Abbauproduktes von Eiweißkörpern, das aus Tyrosin, Amidophenol und Inosit bestehen soll und für das er den Namen Tyrophenosit vorschlägt. Trotz der Bestätigung dieses Befundes durch J. Müller[3]) besteht noch immer die Frage, ob wir in diesem beschriebenen Körper ein Individuum vor uns haben, wie es der angegebenen Formel entspricht; denn der Inosit wurde im vorliegenden Falle nur auf Grund der Schererschen Farbenreaktion konstatiert, was doch als ungenügend bezeichnet werden muß.

Mögen schließlich alle diese Befunde wie auch immer gedeutet werden, es ist bisher noch kein Anhaltspunkt gewonnen worden, der mit Sicherheit irgend eine bestimmte Substanz als Quelle des Körperinosits erscheinen ließe.

Die Annahme, daß der in der Nahrung enthaltene freie Inosit auch die Quelle für den freien Inosit tierischer Gewebe darstellen sollte, hat wenig Wahrscheinlichkeit für sich; denn wir wissen jetzt auf Grund der früher mitgeteilten Versuche, daß der Inosit aus dem Darme nur zum geringen Teile unverändert resorbiert wird, daß er vielmehr zum größten Teile

[1]) H. Klein, Über Vorkommen und Herkunft des Inosits im Tierkörper. Diss., Gießen 1909.

[2]) Danilewski, Über ein neues krystallisiertes Spaltungsprodukt der Eiweißkörper. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 13, 2132, 1880.

[3]) Auf Grund eines Zitates in den Arbeiten Rosenbergers.

der bakteriellen Zersetzung anheimfällt. Dies scheint auch das Schicksal des pflanzlichen freien Inosits im tierischen Darmtractus zu sein.

Aber auch der Rest des durch die Darmwand in den Körper gelangten freien Inosits wird zum größten Teile wieder ausgeschieden. Es ist also ganz ausgeschlossen, daß der in den Geweben vorkommende freie Inosit, dessen Menge doch unverhältnismäßig größer ist als die mit dem Harne ausgeschiedene, als solcher aus der Nahrung aufgenommen werden sollte.

Gar manchen Anhaltspunkt bietet dagegen die bereits früher angeführte Vermutung, daß die Existenz von Inositphosporsäure in tierischen Geweben auch in direkter Beziehung stehe zum freien Körperinosit.[1])

Meine neuerlichen Untersuchungen konnten direkt von der Voraussetzung ausgehen, daß wir in der pflanzlichen Inositphosphorsäure einen für die Inositfrage bedeutungsvollen Körper vor uns haben; denn diese Substanz ist im Pflanzenreiche äußerst stark verbreitet. Nach den Analysen Posternaks sollen in den meisten Pflanzensamen 70 bis 90% der Gesamtphosphorsäure in Form des Phytins vorhanden sein. Es ist somit klar, daß dieses auch einen bedeutenden Teil der phosphorsäurehaltigen Nahrungssubstanzen für den Menschen ausmacht.

Die Inositmenge, die wir in den tierischen Geweben und im Harne finden, stehen aber gewiß in keinem Verhältnis zu der Inositmenge, die wir teils frei, teils in gebundenem Zustande mit der Nahrung aufnehmen. Hinsichtlich des freien Inosits erscheint uns dies auf Grund der früher mitgeteilten Beobachtung erklärlich, da dieser zum größten Teile von den Darmbakterien gespalten wird.

Es schien sehr wahrscheinlich, daß dieses Schicksal auch dem Phytin im Darmtractus zum größen Teile zuteil wird, und der Versuch hat die Richtigkeit dieser Annahme bestätigt.

Setzt man einer Bouillon, die mit Bacterium coli geimpft ist, Inositphosphorsäure in Form eines neutralen Salzes zu, so bemerkt man bald

[1]) Die im folgenden mitgeteilten Resultate wurden zum Teile bereits auf dem VIII. internat. Physiologenkongresse in Wien, Sept. 1910 vorgetragen.

eine recht lebhafte Gasentwicklung, die wohl von der unter gleichen Erscheinungen beobachteten Zersetzung des Inosits herrühren dürfte. Eine Bestimmung der durch Molybdän fällbaren Phosphorsäure vor und nach dem Versuch zeigt ein bedeutendes Ansteigen der anorganischen Phosphate.

Es ist auf diese Weise erklärlich, daß auch nach Verfütterung von Inositphosphorsäure per os ein großer Teil derselben dieser Zersetzung anheimfällt und ein dementsprechend großer Teil der Phosphorsäure in anorganischer Form zur Resorption und Ausscheidung gelangen muß. Dadurch wird es dann auch erklärlich, daß der in den Geweben vorgefundene Inosit bei weitem nicht dem mit der Nahrung aufgenommenen entspricht.

Eine zweite anschließende Frage ist die, wieviel Inosit in gebundener Form zur Resorption gelangt.

Wenn wir nochmals berücksichtigen, daß wir Inosit in reichlicher Menge als Inositphosphorsäure mit der Nahrung aufnehmen, anderseits in wachsenden Organen mehr Inosit zu finden ist als in ausgewachsenen, so legt das die Vermutung nahe, daß auch hier die Phosphorsäure jener Teil der genannten Verbindung ist, der zum Wachstum in Beziehung steht; der Inosit aber, der im Körper keine besondere Verwertung findet, wird wahrscheinlich in den Geweben temporär abgelagert und gelangt von hier aus allmählich zur Ausscheidung.

Der Säugling nimmt — was wir auf Grund der bisherigen Erfahrungen sagen können — dem Inosit gegenüber eine exzeptionelle Stellung ein. Es ist bekannt, daß dies auch für den Phosphorsäurestoffwechsel gilt, und alle diese Momente gaben Anregung zur Untersuchung der Frage, ob nicht auch im tierischen Organismus Beziehungen zwischen Inosit und Phosphorsäurestoffwechsel bestehen.

Wir konnten auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen zu dem Wahrscheinlichkeitsschluß gelangen, daß im wachsenden Organismus alle Vorbedingungen zur Spaltung der Phosphorsäureverbindungen und zu ihrer Verwertung gegeben seien. Der in die Gewebe gelangte Inositphosphorsäureester wird dort in Inosit und Phosphorsäure gespalten, der Phosphor wird beim cellulären Aufbau verwertet, der Inosit vorübergehend in den Geweben abgelagert — daher der größere Reichtum wachsender Gewebe an Inosit — und von hier aus allmählich ausgeschieden.

Es sei vorweggenommen, daß diese Annahme in den folgenden Versuchen ihre vollkommene Bestätigung fand.

Maßgebend für die Richtigkeit unserer Annahme werden in erster Linie die Ausscheidungsverhältnisse von Inosit und Phosphorsäure durch den Harn sein, einerseits beim Säugling, andererseits beim Erwachsenen.

Über die Ausscheidung der Phosphorsäure im Säuglingsalter hatte man bis in die letzte Zeit trotz vielfacher Behandlung dieses Themas unklare Vorstellungen, die durch die widersprechenden Resultate der einzelnen Autoren bedingt waren.

Erst Moll[1]) hat durch gründliche Untersuchungen die Frage des Phosphorsäurestoffwechsels im Säuglingsalter geklärt und fand, daß die Beobachtung der Phosphorsäureausscheidung beim Brustkinde von solcher Bedeutung ist, daß wir darin einen äußerst empfindlichen Indicator dafür haben, ob ein Kind gesund oder krank ist.

Bei stetiger Gewichtszunahme scheidet ein gesundes Brustkind keine Phosphate oder nur Spuren davon im Harne aus. Ein Brustkind, das, ohne Phosphate im Harne auszuscheiden, an Gewicht abnimmt, hungert. Ein Brustkind mit reichlicher Phosphatausscheidung schließlich ist als ernährungskrank zu klassifizieren.

Von diesen interessanten Feststellungen Molls erregt besonders die physiologisch bedeutsame Tatsache unser Interesse, daß gesunde Brustkinder keine Phosphate im Harne ausscheiden, oder nur Spuren davon, was auch durch die Untersuchungen W. Heubners[2]) bestätigt wurde.

Dieser Befund steht mit unseren Vorstellungen von der Bedeutung der Phosphorsäure für den wachsenden Körper in gutem Einklange. Dort, wo die Phosphate verwertet werden, fehlen sie im Harne, andererseits zeigt ihr Auftreten im Harne, daß als Ursache vieler Ernährungsstörungen im Säuglingsalter nicht Mangel an Phosphorsäure angesehen werden darf, sondern die Unfähigkeit des Organismus, diese zu verwerten.

Mit Rücksicht auf unsere experimentellen Untersuchungen war es zunächst wichtig, festzustellen, wie sich die Ausscheidung der Phosphorsäure bei neugeborenen Tieren verhält.

---

[1]) L. Moll, Die klinische Bedeutung der Phosphorausscheidung im Harn des Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk. 69, N. F. XIX, 1909.

[2]) W. Heubner, Üb. d. Phosphorausscheidung eines Neugeborenen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 253, 1909.

Es wurden zwecks derartiger Untersuchungen 4 neugeborene Meerschweinchen in einem Käfig gehalten und ihr Harn gesammelt, desgleichen der Harn des Muttertieres, das sich in einem separierten Käfige befand. Das alte Tier wurde ebenso wie die Jungen mit Möhren gefüttert.

Phosphorsäurebestimmungen durch Urantitration in den beiden Harnen ergaben folgende Resultate:

Harn des Muttertieres 0,23% P_2O_5,
„ der Jungen . . 0,03% „

Nun erhielten alle Tiere Inositphosphorsäure zur Nahrung zugesetzt und dies hatte in beiden Fällen ein bedeutendes Ansteigen der Phosphorsäure zufolge.

Dieser, wenn auch unvollkommene, nur zur Orientierung angestellte Versuch zeigt uns schon, daß auch beim neugeborenen Tiere ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie sie auf Grund der Untersuchungen Molls und Heubners für das Brustkind zu Recht bestehen, denn wir sehen auch im vorliegenden Falle, daß der P_2O_5-Gehalt im Harne des Muttertieres nahezu das 10fache von dem der neugeborenen Tiere beträgt, und daß die Phosphorsäuremenge im Harne der jungen Tiere schließlich überhaupt nur als Spuren bezeichnet werden können.

Das Auftreten von Phosphaten im Harne nach Phytinverfütterung kann natürlich auf zweierlei Art erklärt werden. Es ist möglich, daß das Phytin im Darmtractus gespalten wurde und als anorganisches Phosphat zur Resorption und Ausscheidung gelangte; es könnte aber die Möglichkeit bestehen, daß die neugeborenen Tiere nur eine bestimmte Menge des in den Geweben gespaltenen Phosphors verwerten können und den Überschuß ausscheiden. Zur Erklärung dieser Erscheinungen bedarf es naturgemäß noch ausgedehnter Versuchsreihen.

Erwähnt sei, daß bei einem gesunden Säugling die Verabreichung von 2 g gereinigtem Phytin pro die zu keiner Phosphatausscheidung führte; auch dies verlangt weitgehendere klinische Untersuchungen.

Mit dem eben angeführten Befund über die Ausscheidung der Phosphate im Harne neugeborener Tiere decken sich auch die Angaben von A. Lipschütz[1]), aus dessen Versuchen sich ergab, daß der aus dem Verdauungstractus stammende Kot des

[1]) Alexander Lipschütz, Über den Phosphor des Kotes. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 244, 1909.

wachsenden Organismus bedeutend ärmer an Phosphaten ist als der des Erwachsenen.

Bei dem großen Bedarf des Wachsenden an Phosphorsäure würde allem Anscheine nach der aus der Nahrung stammende anorganische Teil, der außerdem noch teilweise mit den Fäkalien ausgeschieden wird, kaum dem Phosphorbedürfnis des wachsenden Organismus genügen. Es käme also vorwiegend der organische Phosphor der Nahrung in Betracht. Nun hat aber Lipschütz[1]) gezeigt, daß phosphorarm ernährte wachsende Hunde im Laufe von 7 Wochen eine Gewichtszunahme von 100% aufwiesen, woraus sich schließen läßt, daß der wachsende Organismus auch über Reservedepots an Phosphorsäure zur Bestreitung seines Phosphorhaushaltes verfügen muß.

Doch dürften hier gewiß andere Verhältnisse vorliegen, als sie hinsichtlich des Eisenbedarfs für den Säugling gegeben sind.

Während aber nach den vorliegenden Untersuchungen Menschenmilch 0,0005% Fe_2O_3, Kuhmilch 0,001% erhält, weisen diese beiden Milcharten einen Gehalt von 0,047 bzw. 0,24 bis 0,28% an P_2O_5 auf. Für den wachsenden Organismus sind in erster Linie die organischen Phosphorsäureverbindungen von Bedeutung, die in der Frauenmilch zu 77%, in der Kuhmilch zu 27,9% des Gesamtphosphatgehalts vorhanden sind (siehe bei Albu und Neuberg, Physiologie u. Pathologie des Mineralstoffwechsels, S. 134).

Von den organischen Phosphorsäureverbindungen der Milch kommt der größte Teil auf das Nucleon (nach Siegfried zu 54% in der Frauenmilch, zu 13,4% in der Kuhmilch).

Ein kleiner Teil der organischen Phosphate der Milch ist auch in Form der Inositphosphorsäure vorhanden; denn es gelingt, in der Milch nach Ansäuern derselben mit Essigsäure aus dem Filtrat durch Alkali mit den Phosphaten Verbindungen zu fällen, die durch Hydrolyse abspaltbaren Inosit enthalten.

Fällt man aus einem solchen Filtrate die Phosphate durch KOH, wäscht sie auf der Zentrifuge mit Alkali, löst sie dann in verdünnter Essigsäure, so findet man bei ihrer Bestimmung nach den früher genannten verschiedenen Methoden folgende Werte:

Auf 1 l Kuhmilch berechnet fand ich zwischen der Urantitration und der direkten Molybdänbestimmung eine Differenz

[1]) Alexander Lipschütz, Untersuchungen über den Phosphorhaushalt des wachsenden Hundes. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 210, 1910.

von 0,1152 g P_2O_5, was also einem Inositphosphorsäuregehalte von 0,2304 g P_2O_5 entsprechen würde. Diese Zahlen sind gewiß verschwindend klein im Verhältnis zu den anderen organischen Phosphorsäureverbindungen, und es scheint auch sehr wahrscheinlich, besonders mit Rücksicht auf den großen Gehalt der Neugeborenen an freiem Inosit, daß gerade die Inositphosphorsäure einen Hauptbestandteil der Reservedepots an Phosphorsäure für den Säugling darstellt. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß es gelingt, in den Geweben Neugeborener noch ungespaltene Inositphosphorsäure nachzuweisen.

Wenn nun der Organismus die Inositphosphorsäure spaltet, die Phosphorsäure verwertet, den Inosit erst ablagert und dann allmählich ausscheidet, so wird dieses Verhältnis von Phosphorsäure zu Inosit ganz besonders beim Wachsenden deutlich zum Ausdruck kommen müssen. Daß der Neugeborene keine Phosphate ausscheidet, haben wir bereits gesehen, nun steht es mit unseren Vorstellungen auch im guten Einklang, daß es gelingt, bereits in 300 ccm Säuglingsharn deutlich Inosit nachzuweisen, während von Harnen Erwachsener hierzu wenigstens 1 bis 2 l erforderlich sind.

Wir sehen also, daß sich beim Neugeborenen eine leicht erklärliche Korrelation zwischen Inosit und Phosphorsäure ergibt: in den Geweben reichlich Inosit, reichlich Phosphate, im Harn mehr Inosit als beim Erwachsenen, aber keine Phosphorsäure, weder in anorganischer noch in organischer Form.

Anders liegen die Verhältnisse beim Erwachsenen. Hier ist der Phosphorsäureansatz verschwindend klein im Verhältnisse zum wachsenden Organismus, um so größer dementsprechend die Menge der ausgeschiedenen Phosphorsäure.

Im Durchschnitte werden vom Erwachsenen rund 2,5 g P_2O_5 mit Schwankungen von 1 bis 5 g pro 24^h ausgeschieden. Im allgemeinen wird dies von der Nahrung bzw. von der Resorption der anorganischen Phosphate vom Darm aus abhängen. Ein Teil jedoch wird im Organismus aus P-haltigem organischem Material gebildet, wovon in erster Linie die Nucleoproteide, dann Lecithin und andere Phosphatide zu nennen sind. Auch die Phosphate der Knochensubstanz kommen als Quelle der Harnphosphate in Betracht.

Nach dem oben Gesagten wird aber auch die Möglichkeit zu erörtern sein, ob nicht von den mit der Nahrung auf-

genommenen organischen Phosphorsäuren ein Teil unverändert im Harne erscheint, vor allem beim Erwachsenen, der ja die Phosphorsäure nicht in dem Maße verwendet wie der Säugling, wo also möglicherweise auch für die Spaltung der organischen Phosphorsäureverbindungen andere Vorbedingungen gegeben sind.

Unbekümmert um alle früheren Untersuchungen über die Existenz organischer Harnphosphate habe ich vorerst ohne Berücksichtigung der Art der Phosphate aus einer größeren Menge von Menschenharn die Phosphate durch Alkali gefällt. Während dadurch wohl im allgemeinen nur anorganische Phosphate zur Fällung kommen, müssen auch gerade die in Alkali unlöslichen Salze der Inositphosphorsäure in dieser Fraktion mit fallen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, auf der Zentrifuge mit verdünntem Alkali gewaschen und nachher mit Schwefelsäure hydrolysiert. Hierauf wurde mit Bleicarbonat neutralisiert, das Filtrat noch mit neutralem Bleiacetat gefällt und mit der früher angegebenen Methode[1]) eine Inositbestimmung vorgenommen. Es gelang, Inosit nachzuweisen.

Da der freie Inosit in Alkalien gut löslich ist, so kann der im vorliegenden Falle nachgewiesene, nur durch die Hydrolyse der Harnphosphate frei geworden sein.

Vermehrte orale Zufuhr von Inositphosphorsäure in Form des Phytins bedingt eine, wenn auch geringe Zunahme des aus den Harnphosphaten darstellbaren Inosits.

In den eben mitgeteilten Versuchen wurde nur die eine Komponente der Inositphosphorsäure berücksichtigt, der Inosit. Aber auch der Gehalt an anorganischer und organischer Phosphorsäure wird durch die Menge der ungespaltenen gepaarten Inositphosphorsäure im Harne beeinflußt werden.

Auf die früheren Arbeiten über den Übergang von organischen Phosphorsäuren in den Harn und über deren Bedeutung kommen wir später noch zurück.

Aus dem einleitend über die Methodik Gesagten geht hervor, daß wir imstande sein werden, auch im Harne aus der Differenz der Zahlen, die durch die Phosphorsäurebestimmungsmethoden mit Uranacetat, Magnesiamixtur einerseits und molybdänsaurem Ammon anderseits gewonnen werden, Schlüsse zu ziehen auf die Menge jener Phosphorsäureverbindungen, die in einer Bindung nach Art der Inositphosphorsäure im Harne vorhanden sind.

[1]) E. Starkenstein, Über Inositurie und die physiologische Bedeutung des Inosits. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5, 1908.

Es handelte sich vorerst darum, festzustellen, ob normale Harne eine Differenz in der Phosphorsäurezahl ergeben bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer der genannten Methoden.

Der Harn eines 1970 g schweren Kaninchens wird in 2 Portionen untersucht:

Probe I. Phosphatbestimmung durch Fällung mit ammoniakalischer Magnesiamixtur.

Probe II. Fällung mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung, anschließend Umfällung mit Magnesiamixtur, schließlich Phosphatbestimmung ebenso wie bei I. durch Titration mit Uranacetat.

Die Berechnung der Phosphorsäure auf die Tagesmenge ergab

nach I. 0,2208 g P_2O_5,
„ II. 0,1552 g „

Nun erhielt das Kaninchen 2 g Phytin in salzsaurer Lösung per os.

Zum Studium des Schicksals des Phytins im tierischen Organismus wäre eigentlich die parenterale Zufuhr der Substanz angezeigt, da so die Zersetzung durch die Darmflora umgangen würde; doch wurde davon Abstand genommen und das Phytin per os gegeben, weil dies die Art ist, in der wir mit der Nahrung die Inositphosphorsäure einführen.

In den 24 Stunden nach Verabreichung der Substanz schied das Kaninchen aus:

nach I. 0,5001 g P_2O_5 = +0,2793 g } gegenüber
„ II. 0,3776 g „ = +0,2224 g } dem Vortage.

Die Differenz zwischen I. und II. (entsprechend dem Gehalt an organischem Phosphor) beträgt

am Normaltag: 0,0656 g P_2O_5,
am Versuchstag: 0,1225 g „

Wollen wir diese Zahlen für Inositphosphorsäure berechnen, so sind die Differenzwerte zu verdoppeln, da die Bestimmung durch Urantitration nur den halben Phosphorsäurewert ergibt.

Daß auch am Versuchstage die Zahl der durch Molybdän bestimmten Phosphorsäure anstieg, ist erklärlich, da ein großer Teil der zugeführten P_2O_5 in anorganischer Form resorbiert und wieder ausgeschieden wird. Doch ist aus dem Ansteigen der Differenz zwischen den einzelnen Methoden ersichtlich, daß auch ein Teil der Substanz unverändert in den Harn übertritt, zumal auch nach der Verfütterung dieser Substanz die aus den Harnphosphaten abspaltbaren Inositmengen ansteigen.

Zu gleichem Resultate führten folgende Versuche:
Phosphatgehalt eines Kaninchenharns pro die:

1. Tag.

Durch Urantitration gefunden	0,3057 g P_2O_5,
„ Molybdänbestimmung gefunden	0,2955 g „
Differenz	0,0102 g P_2O_5.

2. Tag.

Urantitration	0,3209 g P_2O_5,
Molybdänbestimmung	0,2996 g „
Differenz	0,0213 g P_2O_5.

Nun erhält das Tier eine Lösung von 40 ccm inositphosphorsaurem Ca per os, von der 10 ccm = 0,1070 g P_2O_5 durch Urantitration bestimmt. Durch Molybdän war in der Lösung keine meßbare Fällung zu erzielen.

Nun wurde der Harn in gleicher Weise untersucht wie an den Vortagen. Das Tier hat am ersten Tage nach Verabreichung der Substanz nichts gefressen.

1. Tag.

a) Urantitration	0,4178 g P_2O_5,
b) Molybdän direkt	0,3607 g „
c) Molybdän nach der Veraschung	0,4538 g „

Differenz zwischen

a) und b)	0,0571 g P_2O_5,
b) und c)	0,0931 g „

2. Tag.

Urantitration	0,6725 g P_2O_5,
Molybdän	0,5910 g „
Differenz	0,0815 g P_2O_5.

Die Bilanz dieses Versuches ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Bilanz der Phosphorsäureausscheidung.

Im Harn wurde bestimmt	Durch Urantitration bestimmte P_2O_5 g	Durch Molybdän bestimmte P_2O_5 g	Differenz zwischen beiden Fällungen (Organ. P_2O_5)
An 2 Normaltagen	0,6266	0,5951	0,0315
Per os verabreicht	0,4180	—	—
An 2 Nachtagen	1,0903	0,9517	0,1386
An den 2 Nachtagen gegenüber den 2 Vortagen . . .	+ 0,4637	+ 0,3566	+ 0,1071

Aus dieser Bilanz geht hervor, daß das als organische Phosphorsäure verfütterte P_2O_5 vollkommen im Harne wieder

ausgeschieden wird, zum Teil unverändert in organischer Bindung. Da die Differenz, die dem organisch gebundenen P_2O_5 entspricht, doppelt zu nehmen ist, ist ersichtlich, daß hier ein großer Teil (60%) der Harnphosphate in organischer Bindung ausgeschieden wurde, der bei bloßer Bestimmung durch Urantitration oder Magnesiafällung der Berechnung entgangen wäre.

Aus der gleichzeitig ausgeführten Veraschung und nachfolgenden Molybdänbestimmung geht wiederum hervor, daß die Urantitration nur den halben organischen Phosphorsäurewert angibt, da nach der Veraschung die Differenz fast um das Doppelte ansteigt.

Schließlich sei noch ein Versuch mit Phytinverfütterung am Menschen angeführt, der die im Tierversuche gewonnenen Resultate auch für den Menschen bestätigt.

Versuchsperson Verfasser.

Von einer Tagesmenge Harn (1500 ccm) wurden in 150 ccm durch Molybdänsalpetersäure die Phosphate bestimmt, 150 ccm wurden nach Neumann verascht und hierauf die Phosphorsäure ebenfalls durch die Molybdänmethode bestimmt.

Für die Tagesmenge ergab sich:

Durch direkte Molybdänbestimmung . . 2,83 g P_2O_5
Nach der Veraschung . . . . . 3,01 g „

Es besteht somit eine Differenz von 0,18 g, die als organisch gebundene Phosphorsäure in Rechnung gezogen wird. Nun werden ungefähr 6 g käuflichen Phytins per os genommen. Am nächsten Tage beträgt die Harnmenge 1770 ccm.

Die Phosphorsäurebestimmung ergab:

Durch direkte Molybdänbestimmung . . 4,68 g P_2O_5
Nach der Veraschung . . . . . 4,92 g „

Differenz 0,24 g „

Wir sehen wohl auch hier eine Zunahme der organischen Phosphorsäure, doch nicht im gleichen Maße wie beim Kaninchen; es wird dies erklärlich aus der Berechnung des Phosphorsäuregehaltes des Phytins. 6 g der Substanz enthalten eben zu wenig P_2O_5, um größere Ausschläge zu geben. Es wurde deshalb ein zweiter Versuch durchgeführt, wobei größere Phytinmengen genommen wurden und zwar innerhalb 24 Stunden am Versuchstage: 40 g Phytinum liquidum, 10 g Phytin in Pulverform.

Der Phosphatgehalt betrug am Normaltage: In 1600 ccm Harn:

Durch Urantitration bestimmt 3,26 g P_2O_5
Durch Molybdän direkt . . 3,17 g „
Nach der Veraschung . . . 3,34 g „

Nach Einnahme der oben angegebenen Phytinmenge fanden sich:

Durch Urantitration bestimmt 5,37 g P_2O_5
Durch Molybdän direkt . . 5,19 g „
Nach der Veraschung . . . 5,54 g „

In den nächsten 24 Stunden waren wieder die normalen Verhältnisse eingetreten.

Die Bilanz dieses Versuches ergibt:

Am Vortage: Differenz zwischen direkter Molybdänbestimmung und Urantitration: 0,09 g P_2O_5, zwischen Molybdänbestimmung vor und nach der Veraschung 0,17 g P_2O_5.

Am Versuchstage: Differenz zwischen direkter Molybdänbestimmung und Urantitration: 0,18 g P_2O_5.

Zwischen Molybdänbestimmung vor und nach der Veraschung: 0,35 g P_2O_5.

Wir sehen zunächst aus dieser Bilanz, daß wiederum die Differenz I nur den halben Wert der tatsächlich vorhandenen organischen Phosphorsäure anzeigt; ferner zeigt sich ein Ansteigen der organischen Phosphorsäure von 0,17 g auf 0,35 g also + 0,18 g P_2O_5. Daß dieser Wert nur verschwindend klein ist im Verhältnisse zu der zugeführten organischen Phosphorsäure, erscheint auf Grund des früher Gesagten erklärlich. Jedenfalls zeigt sich wiederum der unveränderte Übergang von Inositphosphorsäure in dem Harn Erwachsener neben vermehrter Ausscheidung von anorganischen Phosphaten nach reichlicher Phytinaufnahme.

Die zuletzt mitgeteilten Versuche geben uns auch bereits Anhaltspunkte für das Schicksal der Inositphosphorsäure im Körper. Dasselbe soll jedoch erst später mit anderen organischen Phosphorsäuren ausführlicher besprochen werden. Das, was wir dem bisher Gesagten mit voller Sicherheit entnehmen können, ist das Bestehen naher Beziehungen zwischen Inosit und Phosphorsäurestoffwechsel.

Das Verhalten der Inositausscheidung beim wachsenden Individuum und das Auftreten einer an Inosit gebundenen Phosphorsäure im Harn geben uns hierfür eine gute Bestätigung. Das letzt-

erwähnte Moment dürfte aber auch beweisen, daß der aus der Nahrung stammenden Inositphosphorsäure eine besondere Bedeutung als Quelle für den freien Körperinosit zukommt.

Der Nachweis einer Substanz im Körper, die als Quelle des freien Körperinosits angesehen werden kann, bringt uns die Inositogenannahme Rosenbergers[1]) wieder in Erinnerung.

Rosenberger zog aus seinen Untersuchungen den Schluß, „daß die Organe erwachsener Kaninchen und wahrscheinlich auch der Rinder zwar frei von fertiger Zyklose sind, dafür aber eine Muttersubstanz oder Muttersubstanzen desselben enthalten, aus denen sich Inosit bei Ausschluß der Fäulnis nach dem Tode bildet und die er als Inositogen bezeichnet. Ebenso verhält sich die Milch."

Wenn man im Phytin auf Grund der Vorstellung Posternaks ein Inositogen annehmen dürfte, so ist dies auf Grund der Befunde Neubergs unzulässig, da ja auch in diesem Falle der fertige Inosit dem Körper zugeführt wird. Daß die Abspaltung des Inosits aus der Inositphosphorsäure nicht den Vorstellungen Rosenbergers entspricht, geht auch daraus hervor, daß dieser in der Bildung von Inosit aus dem Inositogen einen postmortalen Prozeß sieht, während doch auf Grund unserer Erfahrungen die Abspaltung von freiem Inosit gerade eine Funktion des wachsenden Organismus darstellt.

Aus den bisher mitgeteilten Befunden werden sich aber auch gewisse Differenzen in der Inositfrage erklären lassen.

Solche bestanden zunächst zwischen den Befunden Rosenbergers und meinen früheren Mitteilungen. Während Rosenberger behauptete, daß frische Muskeln keinen fertigen Inosit enthalten, konnte ich solchen in genügender Menge in frischen Muskeln und im Gehirn eben getöteter Tiere nachweisen.

Man würde geneigt sein, anzunehmen, daß die Extraktion der Gewebe mit schwach saurem Wasser einerseits, mit KOH anderseits, die Ursache dieser Differenzen ist, indem durch die erste Art der Extraktion Inositphosphorsäure gespalten wird und dadurch erst Inosit frei wird, während in der alkalischen Extraktionsflüssigkeit Inositphosphorsäure unlöslich und unangreifbar ist. Doch ist zu bedenken, daß auch Rosen-

[1]) F. Rosenberger, Die Beziehungen der Zyklosen zum tierischen Organismus. Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 34.

berger die in Ätzkali gelösten Organe dann ohne zu filtrieren ausgiebig mit Salpetersäure behandelt, so daß auch hier die Abspaltung von freiem Inosit erfolgen müßte.

Ich glaube aber nach wie vor, daß die ausgiebige Behandlung mit konzentrierter Salpetersäure nicht nur eine vollständige Abspaltung des freien Inosits zur Folge hat, sondern weiter auch eine Oxydation desselben und daß dadurch die oben erwähnten Differenzen zu erklären sind.

Wie wir später sehen werden, beruht die Abspaltung von Inosit aus seiner Verbindung mit der Phosphorsäure auf fermentativen Prozessen. Daß solche sowohl intravital wie auch postmortal vor sich gehen können, ist genügend bekannt. Anderseits haben wir gesehen, daß der Zerfall dieser Substanz auch spontan sehr leicht erfolgen kann, und beides macht es erklärlich, daß Rosenberger im Muskel nach Eintritt der Autolyse mehr Inosit gefunden hat als im frischen; doch ist auch die früher mitgeteilte Beobachtung von der Abnahme des Inosits bei fortschreitender Autolyse in gutem Einklang zu bringen mit der beobachteten Bildung von Milchsäure aus Inosit.

Auch gewisse Veränderungen in der Milchsäurebildung einerseits, der Phosphorsäureausscheidung anderseits, die unter abnormen Bedingungen beobachtet wurden, lassen sich durch die abnorme Spaltung der Inositphosphorsäure gut erklären. So ist nach starker Muskelarbeit, sowie nach Eintritt der Totenstarre im Muskel eine Aciditätszunahme beobachtet worden, die zum Teile der Bildung von Milchsäure, zum Teile auch der Bildung freier Phosphorsäure zugeschrieben wird.

Es beobachteten Weyl und Zeitler[1]) bei unilateraler Tetanisierung von Kaninchenmuskeln stets eine Vermehrung der Phosphorsäure auf der gereizten Seite und Siegfried und Macleod[2]) fanden in Übereinstimmung damit eine Verminderung des organischen Phosphors im Muskel bei Tetanus.

Klug und Olsavsky[3]) beobachteten auch eine Vermehrung der Phosphorsäureausscheidung im Harne bei der Muskelarbeit.

---

[1]) Weyl und Zeitler, Über die sauere Reaktion des tätigen Muskels. Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 557, 1882.

[2]) J. Macleod, Zur Kenntnis des Phosphors im Muskel. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 535, 1899.

[3]) Klug und Olsavsky, Der Einfluß der Muskelarbeit auf die Phosphorsäureausscheidung. Pflügers Arch. 54, 21, 1893.

Endlich fand v. Fürth[1]) in frischen Kaninchenmuskeln 0,311 bis 0,357% P_2O_5 in anorganischer Form. 1 bis 2 Tage nach dem Tode jedoch 0,322 bis 0,353% und 3 Tage nach dem Tode 0,372 bis 0,417%. Auch hier scheint es sich um einen Zerfall organischer Phosphorverbindungen nach dem Tode (wahrscheinlich durch autolytische Fermente) zu handeln.[2])

Wir haben also in der Vermehrung des freien Inosits bei der Autolyse bei gleichzeitiger Zunahme der anorganischen Phosphorsäure auf Kosten der organischen, sowie unter gleichzeitiger Bildung von Milchsäure ein unterstützendes Moment für unsere Annahme, daß der Inosit in direkter Beziehung zum Phosphorsäurestoffwechsel steht.

Ganz wie im Tierreiche scheint auch im Pflanzenreiche der Inositphosphorsäure eine besondere Rolle bei der Assimilierbarkeit der Phosphorverbindungen zuzukommen.

Auf Grund der Untersuchungen Meillères ist auch der freie Inosit im Pflanzenreiche weitverbreitet. Er stellt nach dessen Untersuchungen einen normalen Bestandteil des Parenchyms der Blätter höherer Pflanzen dar.

Vohl, Külz und zahlreiche andere Autoren fanden Inosit am reichlichsten in unreifen Früchten. Wenn wir nun auch das Phytin, die Inositphosphorsäure und deren Beziehung zum freien Inosit betrachten, so ergibt sich, daß dieses am reichlichsten in den Samen vorhanden ist und bei der Keimung zur Spaltung kommt. Beim Wachstum der Pflanze wird dann die freie Phosphorsäure zum Aufbau verwertet und wir finden dann auch in den grünen Blättern und in den unreifen Früchten die größten Mengen von freiem Inosit. Ich erwähne hier die Arbeiten von Balicka-Iwanowska[3]) und Suzuki und Yoshimura[4]).

---

[1]) O. v. Fürth, Über die Gerinnung der Muskeleiweißkörper und deren mutmaßliche Beziehung zur Totenstarre. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 543.

[2]) O. v. Fürth, Chemie des Muskelgewebes. Oppenheimers Handb. der Biochemie 2, 2, 268.

[3]) Balicka-Iwanowska, Zur Kenntnis der physiologischen Rolle des Phytins bei der Ernährung der Pflanze. Zit. nach Malys Jahresb. d. Tierchem. 36, 741.

[4]) Suzuki und Yoshimura, Über die Verbreitung von anhydrooxymethylendiphosphorsauren Salzen oder Phytin in Pflanzen. Zit. n. Malys Jahresber. der Tierchem. 37, 1107.

Wir haben es also hier mit ganz ähnlichen Vorgängen in der tierischen und pflanzlichen Zelle zu tun. Schon der Embryo dürfte wohl durch das mütterliche Blut Inositphosphorsäure zugeführt erhalten, später bekommt dies der Neugeborene wenigstens zum Teil durch die Milch und schließlich durch die vegetabilische Nahrung. Solange der wachsende Organismus die Phosphorsäure verwertet, wird diese Verbindung gespalten und der Inosit erst temporär in den Geweben abgelagert und von hier aus allmählich ausgeschwemmt. Sobald aber der Phosphor beim cellulären Wachstum keine so wichtige Rolle mehr spielt — und wir erkennen dies an der zunehmenden Phosphatausscheidung im Harne — sehen wir auch einen Teil der resorbierten Inositphosphorsäure unverändert neben großen Mengen anorganischer Phosphate im Harne auftreten.

Das Wichtigste, was aus diesen Befunden für die gesamte Inositfrage resultiert, ist zunächst eine Bestätigung der schon früher aufgestellten Behauptung, daß dem freien Inosit keine besondere physiologische Bedeutung im Organismus zukommt, daß dieser vielmehr als ein Abfallsprodukt eines Teiles des Phosphorsäurestoffwechsels angesehen werden muß.

Zahlreiche Autoren kamen des öfteren zu dem Schlusse, daß der Inosit gewiß eine bedeutende, bisher noch unbekannte Rolle bei der Glukosurie und vielleicht auch bei anderen pathologischen Prozessen zu spielen scheint. Für derartige Anschauungen wurde nun in den vorliegenden Untersuchungen nicht nur kein Anhaltspunkt gefunden, es ist vielmehr klar geworden, daß die Bedeutung des Inosits auf einem anderen Gebiete gelegen ist, als dort wo sie stets gesucht wurde. Aus der Feststellung solcher Tatsachen ergibt sich aber auch die Notwendigkeit, fortan immer zwischen freiem und gebundenem Inosit zu unterscheiden.

Es ist als sicher anzunehmen, daß der Inosit für den Phosphorsäurestoffwechsel, namentlich des jugendlichen Organismus, eine gewisse Bedeutung besitzt, doch nur, solange er gebunden ist. Hierin ist sicherlich sein physiologischer Wert gelegen und hier haben auch neue Untersuchungen einzusetzen, die die Rolle des Inosits im Organismus erklären wollen.

III.

Das Schicksal organischer Phosphorsäuren im Organismus.

In der Inositphosphorsäure haben wir auf Grund der bisherigen Mitteilungen eine organische Phosphorsäure vor uns, die aus folgenden analytischen Gründen als ein normaler Bestandteil des Harns angesehen werden kann:

1. In den durch Alkalien aus dem Harn gefällten und mit Alkalien gewaschenen Phosphaten läßt sich nach Hydrolyse Inosit nachweisen.

2. Die Bestimmung der Harnphosphate durch Urantitration und Fällung mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung vor und nach der Veraschung, ergibt Differenzen, von denen die zwischen direkter Molybdänfällung und Urantitration fast genau halb so groß ist, wie die zwischen den beiden Molybdänfällungen. Da dies Eigenschaften der Inositphosphorsäure sind kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß die auf diese Weise im normalen Harn nachgewiesene gepaarte Phosphorsäure mit Inositphosphorsäure identisch ist.

Die Ausscheidung organisch gebundener Phosphorsäure durch den Harn war schon oft Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen und es zeigen selbst die letzten Arbeiten über dieses Thema, daß dasselbe noch immer nicht geklärt ist.

Die letzte diesbezügliche Untersuchung von Kura Kondo[1]) bringt zunächst eine kurze Zusammenstellung von früheren Mitteilungen über das Auftreten von organischem Phosphor im Harne. Der Autor bespricht die Arbeiten von Lépine und Eymomet, Zuelzer, Bülow, Pasqualis, P. Marcuse, H. Oertel, Keller, Mandel und Oertel, Le Clerk und Cook, Bergmann und Marfori, auf die hier ebenfalls hingewiesen sei.

Zur Ergänzung dieser Zusammenstellung sei noch auf die Arbeiten von G. Politis[2]), Ceconi[3]), Cronheim und Müller[4]), André

---

[1]) Kura Kondo, Die Ausscheidung organisch gebundenen Phosphors. Diese Zeitschr. 28, 200, 1910.

[2]) G. Politis, Über das Verhältnis der Phosphorsäure zum Stickstoff im Harn bei Fütterung mit Gehirnsubstanz. Zeitschr. für Biol. 20, 193.

[3]) Ceconi, Die Ausscheidung des organischen Phosphors während hohen Fiebers und starker Dyspnoe. Centralbl. f. med. Wissenschaften 19, 883.

[4]) W. Cronheim und E. Müller, Zur Kenntnis der Bedeutung des organisch gebundenen Phosphors für den Stoffwechsel. Jahrb. f. Kinderheilk. 52, 360.

Sanson[1]), L. Jolly[2]) und Douglas Simmers[3]), Marfori[4]), Le Clerk und Cook[5]) hingewiesen, die ebenfalls teils normale, teils pathologische Harne auf das Vorhandensein organischer Phosphorsäure untersuchten. Auch in der bereits früher erwähnten Arbeit Molls wurde stets auf das Auftreten von organisch gebundener Phosphorsäure Rücksicht genommen. Als Resultat der meisten bisherigen Untersuchungen ergab sich, daß der Harn normalerweise geringe Mengen organischer Phosphate enthält. Von einem Teil der Untersucher wird selbst dies bestritten. Anderseits ist es auffällig, daß die Werte für die gefundene organische Phosphorsäure äußerst klein sind; es handelt sich meistens um Differenzen in der 2. Dezimalstelle, und zwar zu 2 bis 3% der Gesamtphosphorsäure.

Neben dem Auftreten der organischen Phosphate im normalen und pathologischen Harne wurde auch auf das Schicksal organischer Phosphorsäuren im Körper Rücksicht genommen, vor allem auf die Nucleinsäuren und die Glycerophosphate.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind ziemlich widersprechend. Im allgemeinen gilt der organische Teil der genannten Verbindungen als leicht oxydierbar und die Phosphorsäure gelangt dann auch in anorganischer Form zur Ausscheidung. Bloß nach Zufuhr größerer Mengen derartiger Verbindungen steigt auch der Wert für die organischen Harnphosphate. Was endlich die Verwertbarkeit der resorbierten Phosphorsäure im Organismus betrifft, so geht die Ansicht dahin, daß die Phosphorsäure der Glycerophosphate nach subcutaner Injektion rasch und vollständig durch den Harn ausgeschieden wird, während Lecithinphosphorsäure retiniert und assimiliert werden kann. (Marfori.) Vollkommen unbekannt ist noch immer die Art der geringen Mengen organischen Phosphorsäuren, die im normalen Harne gefunden wurden.

Die in den beiden ersten Kapiteln dieser Mitteilung gewonnenen Erfahrungen dürften uns in manchen bisher ungeklärten Fragen bezüglich der Ausscheidung und dem Schicksal organischer Phosphorsäureverbindungen Aufklärung bringen, vorerst durch Berücksichtigung der Methodik, dann aber be-

---

[1]) André Sanson, Über die Assimilierbarkeit der Glycerophosphate. Compt. rend. soc. de biol. 48, 685.

[2]) L. Jolly, Untersuchungen über den Harnphosphor Compt. rend. 127. Chem. Zentralbl. 2, 498, 1898.

[3]) Douglas Simmers, Ein Beitrag zur Kenntnis der Ausscheidung organischen Phosphors im Urin. The journ. of path. and bact. 10, 159.

[4]) Marfori, Sul Assorbimento e sulla Assimilatione dei Composti „Organici" del Fosforo. Arch. f. experim. Pathol. und Pharm. Festschrift f. Schmiedeberg 1908, 378.

[5]) Le Clerk und F. C. Cook. Stoffwechsel mit organischem Phosphor. Journ. of biol. chem. 2, 203.

sonders durch Rücksichtnahme auf die Inositphosphorsäure als eine im normalen Organismus vorkommende organische Phosphorsäure.

Was die Methodik betrifft, so ist den meisten hierhergehörigen Arbeitern ein Fehler unterlaufen, der bereits im chemischen Teile vorstehender Untersuchungen besprochen wurde: die Art der Trennung organischer und anorganischer Phosphorsäureverbindungen. Fast durchwegs wurde die anorganische Fraktion durch Fällung mit ammoniakalischer Magnesiamixtur, seltener durch Molybdänsalpetersäure bestimmt, die organische entweder aus der Differenz nach der Veraschung des Gesamtharnes oder direkt durch Veraschung des Magnesiafiltrates.

Dort, wo es sich darum handelte, Glycerinphosphorsäure oder ähnliche Verbindungen nachzuweisen, ist gegen die erwähnte Methodik nichts einzuwenden, bei Bestimmungen der gesamten organischen Phosphorsäure mußte jedoch die fast konstant in Harnen Erwachsener in geringen Mengen vorkommende Inositphosphorsäure der Bestimmung entgehen, da sie, wenigstens zum größten Teile, mit Magnesiamixtur gefällt wird, daher als anorganisches Phosphat mitbestimmt wird. Ein quantitatives Fällungsmittel für Inositphosphorsäure ist Magnesiamixtur aus dem früher angeführten Grunde nicht und es kann mit allergrößter Wahrscheinlichkeit behauptet werden, daß jene kleinen Mengen organischer Phosphorsäure, die in normalen Harnen gefunden wurden, jenen geringen Teil der Inositphosphorsäure darstellt, der der Fällung mit Magnesiamixtur entgangen ist.

Wenn wir die im zweiten Teile vorliegender Untersuchungen mitgeteilten Zahlen über den Gehalt normaler Harne an organischer Phosphorsäure nochmals betrachten, so sehen wir, daß diese bedeutend größer sind, als bisher allgemein angenommen wurde.

Aber auch jene Untersuchungen, die in pathologischen Fällen auf die Ausscheidung organischer Phosphorsäure Rücksicht nahmen, sind nach dem eben Mitgeteilten zu beurteilen.

Bloß in der Arbeit Molls finde ich jene Methodik zur Bestimmung organischer Phosphorsäure in Anwendung gebracht, die durch die Molybdänbestimmung vor und nach der Ver-

aschung den wirklichen Gehalt an organischer Phosphorsäure angibt.

Aber auch eine andere Bestätigung meiner Angaben bezüglich des chemischen Verhaltens der wohl in erster Linie in Frage kommenden Phosphorsäure und ihre Berechnung finde ich in den Untersuchungen Molls.

Bei einem ernährungskranken Kinde fand Moll:

1. In 100 ccm Harn mit Uranlösung titriert = 0,1350 g P_2O_5.
2. In 100 ccm mit Molybdänlösung und Magnesiamixtur direkt gefällt = 0,1288 g P_2O_5.
3. In 100 ccm nach Veraschung (Neumann) und Molybdänlösung-Magnesiamixtur gefällt = 0,1596 g P_2O_5.

Wir sehen hier zunächst, daß der durch direkte Molybdänbestimmung gefundene Phosphorsäurewert kleiner ist als der durch Urantitration gewonnene; andererseits aber ist der Phosphatgehalt, der nach der Veraschung bestimmt wurde, größer, als nach der Urantitration. Dies scheint nun völlig begreiflich:

Durch Urantitration wird neben der anorganischen Phosphorsäure auch das Phytin mitgefällt, bei der Berechnung jedoch nur zur Hälfte bestimmt, da, wie wir früher gesehen haben, ein UO_2 zwei Phosphorsäuremolekülen entspricht.

Nach der Veraschung nun kommt der gesamte organische Phosphatgehalt zur richtigen Berechnung.

Im vorliegenden Falle beträgt die Differenz zwischen direkter Molybdänfällung und Urantitration: 0,0062 g P_2O_5, die Differenz zwischen direkter Molybdänbestimmung und solcher nach der Veraschung: 0,0308 g P_2O_5. Da die erste Differenz nur den halben Wert des als Inositphosphorsäure vorhandenen organischen Phosphates angibt, so können wir mit größter Wahrscheinlichkeit behaupten, daß von den gesamten organischen Phosphaten 0,0124 g auf die Inositphosphorsäure entfallen, 0,0184 aber noch auf andere organische Phosphorsäurverbindungen.

Durch die nunmehr mitgeteilten Resultate haben wir auch bereits einen großen Teil vom Schicksal der Inositphosphorsäure im Organismus kennen gelernt.

Mit der Untersuchung über Wirkung und Schicksal des Phytins haben sich bereits früher eine Reihe von Autoren be schäftigt.

Horner[1]) suchte aus den Phosphatzahlen im Harne und in den Faeces nach Phytinverfütterung Schlüsse zu ziehen auf die Größe der Resorption der Substanz. Zu bedenken ist zunächst bei den Untersuchungen des genannten Autors, daß er wohl einen großen Teil seiner verfütterten Phosphorsäure in anorganischer Form zuführte, da er das käufliche Phytin direkt verfütterte und dieses obendrein noch bei 110° getrocknet hatte, wobei es, wie wir aus den oben angeführten Zahlen wissen und was er auch selbst vermutete, zum größten Teile gespalten wird.

Horner fand nun sowohl im Harne als auch in den Faeces ein Ansteigen der Phosphorsäure nach Phytinverfütterung und schloß daraus, daß das Präparat nur unvollkommen resorbiert wird.

Giacosa[2]) prüfte die pharmakologische Wirkung des Phytins und sein Verhalten im Organismus. Er fand, daß dieses im Gegensatze zum Lecithin entschieden giftig sei, daß sich ferner im Phytin der Phosphor viel leichter abspalte als im Lecithin.

Was die Ausscheidung der Substanz betrifft, so fand er eine kaum nennenswerte Vermehrung des organischen Phosphors nach der Verfütterung, schloß daher, daß kein Phytin in den Harn übertritt. Auch Inosit wurde nicht gefunden. Als anorganische Phosphorsäure fand er von der Hunden in Form des Phytins zugeführten $^4/_5$ im Harn, $^1/_5$ im Kot. Die Resorption erfolgt also nahezu vollständig.

Ähnliche Gesichtspunkte berücksichtigen Lafayette, B. Mendel und Frank P. Underhill[3]) bei ihren Untersuchungen über die physiologische Wirkung und das Schicksal des Phytins. Sie fanden, daß das Phytin im Tierversuch geringe Toxicität zeige. Sein Phosphor wird bei Hunden und Kaninchen in anorganischer Form im Harne ausgeschieden. Eine Wirkung auf den Stickstoffumsatz war nicht vorhanden.

Auch in den bisher ausgeführten physiologischen Arbeiten über das Phytin sehen wir gewisse Differenzen auftreten, und hinsichtlich der Methodik der Phosphatbestimmung gilt hier das im speziellen, was wir bei Besprechung der organischen Phosphorsäuren im allgemeinen gesagt haben.

Was nun zunächst die Toxicität der Inositphosphorsäure betrifft, so kann ich auf Grund meiner Erfahrungen nur mitteilen, daß Kaninchen nach Darreichung von größeren Mengen Phytins mit Schlundsonde die erste Zeit nicht fressen, sich jedoch dann bald erholen. Es scheint dies übrigens

[1]) Horner, Zum Verhalten des Phytins im Organismus. Diese Zeitschr. 2, 428, 1906.

[2]) Giacosa, Über die pharmakologische Wirkung des Phytins. Giorn. della R. accad. di med. di Torino. 70, 290.

[3]) Lafayette B. Mendel und Frank Underhill. Amer. journ. of Physiol. 17, 1906.

nicht auf Rechnung der Inositphosphorsäure allein gesetzt werden zu dürfen.

Von einer toxischen Wirkung beim Menschen nach Aufnahme der Substanz per os kann überhaupt nicht die Rede sein. Ich habe bei einem der beschriebenen, an mir selbst durchgeführten Versuche 40 g Phytin. liquidum und 10 g Phytin in Substanz genommen, ohne die geringste Änderung meines Befindens wahrgenommen zu haben.

Was die toxische Wirkung nach intravenöser Injektion betrifft, so ist einerseits zu berücksichtigen, daß auch eine Injektion relativ kleiner Mengen von Na_2HPO_4 nicht gleichgültig ist.

Daß eine 3%ige Lösung der freien Säure intravenös injiziert schon in geringen Dosen für ein Kaninchen tödlich sind, scheint nicht sonderbar. Gilbert und Lippmann[1]), die diese Versuche ausgeführt haben, schreiben aber die Toxicität nicht der saueren Reaktion zu, sondern der Substanz selbst, da auch intravenöse Injektion des neutralen Natronsalzes die gleiche Giftigkeit zeige. Bei meinen Versuchen konnte ich mich ebenfalls von der starken Giftigkeit des intravenös injizierten neutralen Na-Salzes überzeugen. Es ist dies ein unterstützendes Moment für die Annahme, daß die Phosphorsäure in unserer Verbindung in Form der Pyrophosphorsäure vorhanden ist.

Was die Verabreichung per os betrifft, so fanden auch die genannten Autoren, daß hier erst nach hohen Dosen eine Giftwirkung auftrete: für 1 kg Meerschweinchen betrage die letale Dosis 9,5 g des neutralen Natronsalzes.

Bezüglich der Ausscheidungsverhältnisse der Inositphosphorsäure können wir auf Grund der bereits mitgeteilten Zahlen behaupten, daß beim Kaninchen innerhalb 48 Stunden fast alle Phosphorsäure, die in Form von Phytin verabreicht wurde, wieder erscheint.

Wenn Horner nur ca. 40% wiederfand, so mag dies seinen Grund darin haben, daß er eigentlich vorwiegend das

---

[1]) Gilbert und Lippmann, Über das organische Phosphorprinzip der Pflanzensamen. La Presse méd. 69, 1904.

anorganische Calciumphosphat verfütterte, und es ist bekannt, daß diese Kalksalze nur schwer resorbiert werden können.

Die Frage der Resorptionsmöglichkeit ist gewiß von größter Bedeutung.

Alle jene Versuche, die nur die Ausscheidung der Gesamtphosphate berücksichtigen, können hierüber keinen Aufschluß geben: Auch aus den Versuchen Giacosas, der kein unverändertes Phytin im Harn fand, wohl aber fast alle Phosphorsäure in anorganischer Form, beweist nichts bezüglich der Art der Resorption.

Phytin kann unverändert resorbiert werden und in den Geweben gespalten, als anorganisches Phosphat zur Ausscheidung gelangen, es kann aber auch bereits als solches vom Darm aus resorbiert werden.

Auch über diese Frage sowie über das Schicksal der Inositphosphorsäure überhaupt können uns die mitgeteilten Versuche gewissen Aufschluß geben: wir haben zunächst das Schicksal der Inositphosphorsäure diesseits und jenseits der Darmwand voneinander zu unterscheiden.

Wir haben gesehen, daß Bacterium coli in kürzester Zeit Phytin zersetzen und den freien Inosit vergären kann und es ist naheliegend, anzunehmen, daß Inositphosphorsäure zum Teile wenigstens im Darmtractus dieses Schicksal erleidet.

Anderseits aber geht aus dem Mitgeteilten mit aller Sicherheit hervor, daß auch unveränderte Inositphosphorsäure zur Resorption gelangt, sowohl nach Zufuhr in reiner Form als auch von dem täglich mit der Nahrung aufgenommenen. Daß dies aber, wenigstens beim erwachsenen Menschen, nur zum geringen Teile erfolgt, beweist die Bilanz der Phosphorsäureausscheidung.

Von besonderer biologischer Bedeutung endlich ist das Schicksal der Inositphosphorsäure jenseits der Darmwand. Daß die Paarung des phosphorsauren Kalks mit Inosit auch für die Resorption von größter Bedeutung ist und ebenso für die Verwertung desselben, ersehen wir aus dem Schicksal der Verbindung beim Neugeborenen. Da die Fäkalien dieser sehr phosphorarm sind, kann eine nahezu vollkommene Resorption aus der Inositphosphorsäure angenommen werden, während der freie phosphorsaure Kalk in bedeutender Menge unverändert zur

Ausscheidung käme. In den Geweben dürfte das Schicksal der Inositphosphorsäure dasselbe sein, wie das anderer organischer Phosphorsäureverbindungen.

Es haben Suzuki, Yoshimura und Takaishi[1]) als erste nachgewiesen, daß die Spaltung des Phytins in seine Komponenten Inosit und Phosphorsäure auf fermentativen Wege erfolgt durch ein Enzym, das sie als Phytase bezeichnen. Zur Darstellung desselben haben sie Extrakte mit 85%igem Alkohol und Äther gefällt.

Zaleski[2]) hat ebenfalls gefunden, daß die Zersetzung organischer Phosphorsäuren im keimenden Samen durch Fermente erfolge.

Wie Gilbert und Posternak[3]) fanden auch Mc. Callum und Hart[4]), daß die Enzyme des Verdauungstractus Phytin nicht spalten, wohl aber fanden die letzteren Autoren phytinspaltende Fermente im Leberextrakte, sowie in verdünntem Blute. Dabei entsteht anorganische Phosphorsäure.

Die Annahme eines phytinspaltenden Fermentes in tierischen Geweben setzt voraus, daß hinsichtlich der Qualität oder Quantität derselben prinzipielle Unterschiede bestehen müssen zwischen wachsenden und ausgewachsenem Gewebe. Diesbezüglich von mir angestellte Versuche haben diese Annahme bestätigt und damit auch unsere Vorstellungen von der Bedeutung der Inositphosphorsäure.

Für die Fermentversuche wurden die Organe neugeborener Meerschweinchen, sowie des Muttertieres nach der in unserem Laboratorium üblichen Methode[5]) verarbeitet und aus den Pulvern Extrakte mit physiologischer Kochsalzlösung dargestellt oder die gemahlenen Pulver direkt in Suspensionen verwendet.

Es wurden folgende Versuchsreihen aufgestellt:

Gleiche Mengen Fermentlösung und gleiche Mengen Phytin bei schwach alkalischer Reaktion:

---

[1]) Suzuki, Yoshimura, Tokaishi, Über ein Enzym, Phytase, das Anhydrooxymethylendiphosphorsäure spaltet. Bull. of the College of Agriculture. Tokio. Imper. University 7, 503.

[2]) Zaleski, Über die Rolle der Enzyme bei der Umwandlung organ. Phosphorverbindungen im keimenden Samen. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 24, 285.

[3]) Gilbert und Posternak, Über die Phosphortherapie vom Standpunkte des Stoffwechsels aus betrachtet. L'œuvre méd. chirurg., Nr. 36, 1903.

[4]) Mc. Callum und Hart, Über das Auftreten eines phytinspaltenden Enzyms in tierischen Geweben. Journ. of Biolog. Chem. 4, 497

[5]) Wiechowski, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, 1907.

Junges Tier:

Probe I. Aufgekocht nach 24 Stunden durch Molybdän fällbare P_2O_5: 0,0041 g.

Probe II. Wie bei I, jedoch nativ unter Toluol bei 37° nach 24 Stunden P_2O_5: 0,0102 g.

Probe III. Wie bei II, jedoch sofort bestimmt: P_2O_5: 0,0050 g.

Beim alten Tier verhielten sich Proben I und III fast gleich denen des jungen.

Probe II jedoch ergab P_2O_5: 0,0071 g.

Wir sehen also, daß die Zersetzung des Phytins tatsächlich auf fermentativem Wege erfolgt, da sie in den aufgekochten Proben ausblieb. Ferner zeigt sich, daß die fermentative Wirkung beim jungen Tier deutlich stärker ist als beim ausgewachsenen.

Dieses Ferment fand sich nach vorläufigen Versuchen im Gehirn, in den Muskeln und in der Leber, und es läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit behaupten, daß wir es überall dort finden werden, wo freier Inosit und Phosphorsäure nachgewiesen werden können, und das ist bei allen grünen Pflanzen und bei allen höheren Tieren der Fall, und hier fast in allen Organen.

Da Inositphosphorsäure in Form des Phytins als Phosphornahrungsstoff vielfache Verwendung findet, sei auch noch auf den Nutzen hingewiesen, den wir von einer solchen Therapie zu erwarten haben.

Es ist hier nicht am Platze, auf die verschiedenen Grundlagen der Phosphortherapie einzugehen. Nur auf jene Momente sei hingewiesen, die den einschlägigen Arbeiten Molls zu entnehmen sind und die geeignet sein dürften, die Anwendung von Phosphorsäuren als Nährstoffe in richtige Bahnen zu lenken.

Daß für diese Zwecke nur organische Phosphorsäuren zur Verwendung kommen, ist begreiflich. Nun ist aber zu bedenken, daß der normale Säugling genügend Phosphorsäure zur Verfügung hat, der ernährungskranke diese sogar ausscheidet, und die Ausscheidung steigt nach Phosphorsäurezufuhr noch an. Es kann sich also nicht um fehlende Phosphorsäure handeln, sondern um das Unvermögen, diese zu verwerten, und diese Fähigkeit des Organismus führen wir auch mit dem or-

ganischen Phosphorpräparate dem Organismus nicht zu. Für den Erwachsenen scheint eine Indikation für die Zufuhr organischer Phosphorsäuren, auch der Inositphosphorsäure, überhaupt nicht gegeben, da diese entweder in anorganischer oder in organischer Form, teils durch den Harn, teils mit den Fäkalien zur Ausscheidung kommt, so daß der Organismus daraus gewiß wenig Nutzen ziehen kann.

Doch gibt es eine Reihe von Erkrankungen, die sicherlich durch Anomalien des Phosphorsäure-Kalkstoffwechsels bedingt sind. Nun wissen wir von der Inositphosphorsäure, daß sie in der Natur als Kalksalz vorhanden ist und auch als solches mit der Nahrung aufgenommen wird. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Verbindung für den Aufbau des Knochensystems von Bedeutung ist, und es dürfte daher auch für die Therapie der Rachitis und ähnlicher Erkrankungen des Säuglingsalters das Phytin ein wertvolles Präparat darstellen. In solchen Fällen wird das Studium der Ausscheidungsverhältnisse von Phosphorsäure und Kalk unter Berücksichtigung der beschriebenen Methoden gewisse Anhaltspunkte schaffen und zeigen, wieviel davon im Körper retiniert wird. Dann erst wird sich sein therapeutischer Wert bemessen lassen.

Zusammenfassung.

I. Die Beobachtung, daß Inositphosphorsäure mit Uran, Magnesia, Blei, nicht aber mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung unlösliche Verbindungen gibt, führte zu folgenden Resultaten:

Phytin stellt eine Inositphosphorsäure, wahrscheinlich eine komplexe Verbindung, nicht aber eine Anhydroxymethylendiphosphorsäure dar. Es sind eine Reihe von Anhaltspunkten dafür gegeben, daß die Phosphorsäure in Form von Pyrophosphorsäure vorhanden ist, was eine Änderung der bisherigen Auffassung von der Konstitution der Inositphosphorsäure notwendig macht.

Die Bildung des Uransalzes, der sauren Ca-Verbindung usw. erfolgt in der Weise, daß stets ein UO_2 bzw. Ca je eine H-Valenz zweier Phosphorsäuremoleküle besetzt. Daraus erklärt sich der saure Charakter des Ca-Salzes, und es ergibt aus diesem Grunde

eine Titration der Verbindung mit Uranacetat nur den halben Wert der tatsächlich vorhandenen Phosphorsäure.

Das eigenartige analytische Verhalten der Inositphosphorsäure zeigt einerseits, daß bei dieser und ähnlichen Verbindungen aus der Art der Salzbildung Anhaltspunkte für die Konstitution gewonnen werden können, andererseits aber lehrt dieses Beispiel, daß bei Bestimmung organischer und anorganischer Phosphorsäuren nicht schematisch vorgegangen werden dürfe, da z. B. bei derartigen Untersuchungen im Harne Inositphosphorsäure wenigstens teilweise in die mit Magnesiamixtur fällbare Fraktion übergeht, die bisher fälschlicherweise als die anorganische bezeichnet wurde.

II. Die bereits früher mitgeteilten Beobachtungen, daß wachsende Organe, also vor allem die Gewebe Neugeborener, reichlichere Mengen von Inosit enthalten, als bereits Ausgewachsene, legten mit Rücksicht auf die Existenz einer Inositphosphorsäureverbindung in den Pflanzen die Möglichkeit nahe, daß auch im tierischen Organismus derartige Verbindungen vorkommen, woraus sich die Beziehungen des Inosits zum Wachstum erklären ließen. Der Inosit gelangt in Form der Inositphosphorsäure mit der Nahrung in den Körper. Wachsende Individuen vermögen diese Verbindung zu spalten. Die Phosphorsäure wird retiniert und verwertet, der Inosit, der im Körper zum größten Teile unangreifbar ist, wird erst in den Geweben temporär abgelagert und gelangt von hier aus allmählich zur Ausscheidung. Dementsprechend finden sich sowohl in den Geweben als im Harne wachsender Individuen reichlichere Mengen von Inosit, und im Harne von Säuglingen und — wie nunmehr auch nachgewiesen wurde — von neugeborenen Tieren, keine Phosphorsäure. Erwachsene vermögen die Inositphosphorsäure nur partiell zu spalten. Ein Teil geht unverändert ab, was dadurch bewiesen wurde, daß es gelang, Inosit als ein Spaltungsprodukt der Harn- und Körperphosphate — parallel damit auch durch andere Methoden gepaarte Phosphorsäuren — nachzuweisen.

Diese Befunde stützen die Annahme, daß Inositphosphorsäure die Quelle des freien Körperinosits darstellt. Sie bestätigen auch die frühere Behauptung, daß dem freien Inosit keine besondere physiologiche Bedeutung zukomme, weisen

vielmehr darauf hin, daß der freie Inosit als ein Abfallprodukt des Phosphorsäurestoffwechsels angesehen werden muß — ebenso im Pflanzenreich wie im Tierreich. Aus diesem Grunde werden wir künftig zwischen freiem und gebundenem Körperinosit unterscheiden müssen.

III. Bei früheren Untersuchungen über den Gehalt des Harns an organischer Phosphorsäure sind durch Anwendung der Magnesiafällung für die anorganischen Phosphate Fehler unterlaufen, da Inositphosphorsäure nicht berücksichtigt, bzw. zum größten Teile der anorganischen Phosphorsäure zugerechnet wurde. Kleine Reste derselben, die der Magnesiafällung entgehen können, scheinen die normalerweise gefundene organische Phosphorsäure darzustellen.

Inositphosphorsäure ist eine physiologisch in den Geweben und im Harn vorkommende gepaarte organische Phosphorsäure, deren Menge im Harne Erwachsener nach Verfütterung ansteigt. Nach Verabreichung per os wird der größte Teil derselben im Darm bakteriell gespalten, nur ein kleiner Teil unverändert resorbiert.

In den Geweben erfolgt die Spaltung in Inosit und phosphorsaures Calcium durch Fermente, die im wachsenden Organismus in reichlicherer Menge vorhanden sind als beim ausgewachsenen. Als Phosphornährstoff für Erwachsene scheint die Inositphosphorsäure keine besondere Bedeutung zu besitzen, wohl aber als eine natürlich vorkommende organische phosphorsaure Kalkverbindung bei jugendlichen, normalen und kranken Individuen, z. B. bei Rachitis oder ähnlichen Erkrankungen des Knochensystems.

Untersuchungen über den Blutzucker.

VIII. Mitteilung.

Über den Zuckergehalt der Blutkörperchen.

Von

Peter Rona und Dengo Takahashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 22. November 1910.)

Vor etwa 2 Jahren teilten Michaelis und ich[1]) mit, daß sich in den Blutkörperchen nennenswerte Mengen einer rechtsdrehenden, vergärbaren Substanz befinden, und kurz darauf wies Hollinger[2]) die Gegenwart eines reduzierenden Körpers in den Blutkörperchen nach. Dieser Befund erfuhr jüngstens von Lyttgens und Sandgren[3]) insofern eine Bestätigung, als sie ebenfalls einen reduzierbaren Körper in den Kaninchenblutkörperchen aufgefunden haben, den sie aber nicht mit Traubenzucker identifizieren konnten, da er sich als nicht gärungsfähig erwies. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, die Versuche in dieser Richtung wieder aufzunehmen. Über die zunächst an Hunden ausgeführten Versuche gibt folgende Tabelle Aufschluß.

---

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 16, 60, 1909; 18, 375, 1909.

[2]) Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

[3]) H. Lyttgens und J. Sandgren, diese Zeitschr. 26, 382, 1910.

Tabelle I.

Versuch	Tierart	Gewicht g	Entnommene Blutmenge ccm	Blutkörperchen %	Plasma %	% Traubenzucker im Blut vor Gärung	% Traubenzucker im Blut nach Gärung	% Traubenzucker im Plasma vor Gärung	% Traubenzucker im Plasma nach Gärung	% Traubenzucker in den Blutkörperchen (berechnet)
1	Hund	4500	70	38	62	0,210	0,001	0,228	0,003	0,18
2	„	9500	75	47	53	0,170	−0,005 [1])	0,216	−0,004 [1])	0,149
3	„	5000	95	36	64	0,124 0,127 [2])	0,001	0,123	0,001	0,12
4	„	5000	135	37	63	0,158 0,154 0,155 [2])	0,001	0,151	0,001 [1])	0,15
5	„	7000	100	47	53	0,157	0,001	0,158	0,004	0,157
6	„	9500	150	33	67	0,193	−0,001	0,190	0,00	0,190
7	„	12000	50	42	58	0,128	0,00	0,184	0,00	0,056

In methodischer Hinsicht muß zu der Tabelle folgendes bemerkt werden. Zur Untersuchung kamen meist je 25 ccm vom Blut bzw. vom Plasma, genau abgemessen, doch kann die Bestimmung schon an kleineren Mengen (10 bis 15 ccm) exakt ausgeführt werden. Das aus der Carotis leicht narkotisierter Tiere entnommene Blut wurde in mit FNa beschickten Gefäßen aufgenommen, der prozentische Anteil der Blutkörperchen in einem Hämatokriten nach Hedin (mit 10000 Touren in der Minute) bestimmt, wobei so lange zentrifugiert wurde, bis die letzten vier Bestimmungen einen konstanten Wert ergaben. Die Enteiweißung erfolgte stets nach der von Michaelis und mir eingeführten Eisenmethode, die — jetzt bereits nach tausendfältiger Erfahrung — nie versagte und deren Anwendung die Ausführung der ganzen Untersuchung sehr erleichtert hat. In der Wahl des zur Fällung nötigen Elektrolyten ist, wie wir wiederholt betonten, ein weiter Spielraum möglich, doch wird man gerade in dem Falle, in dem alle drei Zuckerbestimmungsarten, Polarisation, Reduktion und Gärung, ausgeführt werden sollen, einige der sonst sehr gut brauchbaren Salze nicht verwenden können. So sind Magnesiumsalze nicht anwendbar, und auch Salze mit einem einwertigen Anion wird man kaum empfehlen, da die viel größeren Mengen, die von diesen Salzen

[1]) Keine Reduktion.

[2]) Bestimmt nach Bertrand.

zur Ausfällung nötig sind, die nachfolgende Gärung hemmen könnten. Gut brauchbar erwies sich Na_2SO_4 und namentlich primäres Natriumphosphat, da, wie bekannt, die Phosphate die Gärung fördern.[1]) Vor der Gärung wurde die bereits polarisierte Lösung etwa 10fach verdünnt und mit Soda vorsichtig zur neutralen bis ganz schwach sauren Reaktion gebracht, dann mit einer auf ihre gute Gärkraft stets geprüften frischen Hefe versetzt und die Flüssigkeit bei zirka 26° 10 bis 12 Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die schwach mit Essigsäure angesäuerte Lösung mit Kaolin behandelt,[2]) filtriert, das Filtrat eingeengt und wieder polarisiert, in einigen Fällen auch noch der Reduktion unterworfen. Als Reduktionsmethode wurde stets die Bertrandsche benutzt. Die gefundenen Drehungen sind auf Traubenzucker bezogen und als solche in der Tabelle angegeben. Da der Fehler der Ablesung $\pm 0{,}01°$ beträgt und die von uns abgelesenen Winkel mindestens 0,20°, gewöhnlich 0,40 bis 0,50°, manchmal bis 0,90° betrugen, so ist der Fehler der Bestimmungen höchstens $\pm 5\%$, meist aber viel niedriger, etwa $\pm 1\%$. Es ist vorteilhaft, die eingeengte Lösung vor der Polarisation mit ganz geringen Mengen von Kaolin zu behandeln. Jeder in der Tabelle angegebene Drehungswert ist ein Mittel aus 12 untereinander bis auf $\pm 0{,}01°$ übereinstimmenden Ablesungen. Die Zahlen in der dritten Dezimale sind natürlich nur als rechnerische Größen zu betrachten.

Aus der Tabelle ergibt sich nun, daß, der früheren Angabe entsprechend, die Blutkörperchen von Hunden eine rechtsdrehende Substanz enthalten. Die Rechtsdrehung ist meist bedeutend, in einer Anzahl der Fälle (3, 4, 5, 6) war die Drehung im Plasma und im Blute gleich.[3]) Der rechtsdrehende

[1]) Salamon und de Vere Matthew, Chemical News 49, 166. — Wroblewski, Journ. f. prakt. Chem. II, 64, 1. — Collette und Boidin, Chem.-Zeitg. 26, 542. — Vgl. auch Oppler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 393.

[2]) Vgl. Michaelis und Rona, l. c.

[3]) Daß diese häufige Übereinstimmung der Werte im Gesamtblut und im Plasma doch nur in gewissen Fällen zu finden ist und unter Umständen eine bedeutende Ungleichheit zwischen dem Zuckergehalt im Plasma und in den Blutkörperchen bestehen kann, zeigen die anderen in dieser und in den früheren Arbeiten mitgeteilten Unter-

Körper ist aber auch gärfähig; in allen unseren Versuchen, bei denen wir das Blut vergoren haben, war die Drehung nach der Gärung gleich 0. Die minimalen, von 0 abweichenden Werte fallen weit innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode. Das vorliegende Tatsachenmaterial zusammenfassend, können wir also sagen, daß sich in den Blutkörperchen der Hunde ein rechtsdrehender, reduzierender, gärfähiger Körper befindet, und es liegt zunächst kein Grund vor, diesen Körper nicht als Traubenzucker anzusehen. Natürlich muß zur endgültigen Klärung der Verhältnisse der Traubenzucker in chemisch wohl charakterisierten Derivaten aus den Blutkörperchen selbst dargestellt werden, eine Aufgabe, die von uns bereits in Angriff genommen worden ist. Das Zusammentreffen der drei charakteristischen Eigenschaften spricht aber mit der allergrößten Wahrscheinlichkeit dafür, daß wir es hier mit Traubenzucker zu tun haben, und auch das Verhalten des fraglichen Körpers beim Aderlaß spricht für diese Annahme.

Seit Cl. Bernard ist es bekannt, daß nach Aderlässen der Zuckergehalt des Blutes sich vermehrt.[1]) An dieser Vermehrung nimmt nun der rechtsdrehende Körper in den Blutkörperchen namhaften Anteil (vgl. Tab. II).

Stets stieg der „Traubenzucker"-Gehalt der Blutkörperchen bedeutend, so beim Hund im Versuch 1 nach 4 Tagen nach dem letzten Aderlaß von 0,149% auf 0,172%, beim Hund im Versuch 2 von 0,12% nach 4 Tagen auf 0,24%, beim Hund im Versuch 3 von 0,15% nach 4 Tagen auf 0,20%.[2]) Nach kürzeren Zeiten war der Anstieg in den meisten Fällen deutlich, in anderen hingegen nicht zu konstatieren. So stieg im Versuch 1 der Zuckergehalt in den Blutkörperchen in 30 Minuten von 0,17 auf 0,22%, bei demselben Hund in einem späteren Versuch in

---

suchungen. So enthielten in einem nach Abschluß dieser Arbeit untersuchten Falle die Blutkörperchen eines Hundes, dessen Plasma 0,21% Zucker enthielt, nur die minimale Menge von 0,02% Zucker, ein Wert, der beim zweiten Aderlaß, nach 1 Stunde, auf 0,04% stieg.

[1]) Von den neueren Arbeiten hierüber vgl. namentlich Andersson, diese Zeitschr. 12, 1, 1908.

[2]) Bei Entnahme kleiner Blutmengen ist die Restituierung des früheren Zustandes schon viel eher erreicht. Vgl. Oppler und Rona, diese Zeitschr. 13, 121, 1908.

Tabelle II.

Versuch	Tierart	Gewicht g	Entnomm. Blutmenge ccm	(Hämokrit-Bestimmung) Blutkörp. %	(Hämokrit-Bestimmung) Plasma %	% Traubenzucker im Blut vor Gärung	% Traubenzucker im Blut nach Gärung	% Traubenzucker im Plasma v. Gärung	% Traubenzucker im Plasma nach Gärung	% Traubenzucker in den Blutkörperchen (berechnet)
I	Hund	9500	75	47	53	0,170	— 0,006 [1])	0,216	— 0,004	0,149
	„ nach 4 Tagen		130	38	62	0,204	0,006	0,222	0,005	0,17
	„ „ 30 Min.		70	38	62	0,222	0,001	0,220	0,009	0,22
	„ „ 3 Tagen		155	33	67	0,193	— 0,001	0,193	0,00	0,19
	„ „ 45 Min.		120	33	67	0,256	0,004	0,260	0,001	0,26
II	Hund	5000	95	36	64	0,124 0,127	0,001	0,123	0,001	0,12
	„ nach 4 Tagen		100	30	70	0,232	0,005	0,244	0,007	0,24
	„ „ 35 Min.		90	30	70	0,230	0,005	0,225	0,005	0,23
III	Hund	5000	135	37	63	0,158 0,154 0,155	0.001	0,151	0,001 [1])	0,15
	„ nach 4 Tagen		100	29	71	0,213	0,00	0,202	0,007	0,20
IV	Hund	7000	150	47	53	0,157	0,001	0,158	0,004	0,157
	„ nach 45 Min.		100	49	51	0,170	0,00	0,203	0,001	0,135
	„ „ 45 „		80	54	46	0,203	— 0,001	0,393	0,001	0,04
V	Hund	12000	120	49	51	0,115	—	0,181	—	0,050
	„ nach 45 Min.		110	51	49	0,111	—	0,141	—	0,0526
	„ „ 45 „		140	58	42	0,125	—	0,179	—	0,0859
VI	Hund	8000	50	42	58	0,128	0,00	0,184	0,00	0,056
	„ nach 45 Min.		75	44	56	0,206	—	0,245	—	0,156
	„ „ 45 „		80	44	56	0,365	—	0,359	—	0,372

[1]) Keine Reduktion.

45 Minuten von 0,19 auf 0,26%. Im Versuch 6 stieg der Zuckergehalt von 0,056% nach 45 Minuten auf 0,156%, nach weiteren 45 Minuten auf 0,372%. Auch in diesen Versuchen konnten wir nach der Vergärung keine Rechtsdrehung mehr konstatieren, so daß wir auch hier, vorläufig wenigstens, die vermehrte Rechtsdrehung auf Traubenzucker beziehen können. Im Versuch 2 konnte hingegen keine Vermehrung nach 35 Minuten nachgewiesen werden.

Interessant gestalten sich die Verhältnisse in einem Versuch, bei dem ein Hund in drei Etappen entblutet worden ist, die zwei letzten Blutentnahmen erfolgten in Zwischenzeiten von 45 Minuten; wenige Minuten nach der letzten Blutentnahme trat der Tod ein. Während nun dabei der Zuckergehalt des Plasmas von 0,158% auf 0,393% stieg, sank derselbe in den Blutkörperchen von 0,157 auf 0,041%! Die fast zuckerfreien Blutkörperchen schwammen also in einem sehr zuckerreichen Plasma. Der Versuch zeigt gleichzeitig, daß das Verhalten der Blutkörperchen nicht bei allen Formen der Hyperglykämie gleichartig ist. Bei der alimentären Glykämie konnten Michaelis und ich[1]) in mehreren Versuchen eine gleichmäßige Beteiligung des Plasmas und des Gesamtblutes an der Erhöhung der Zuckerwerte konstatieren. So wurde z. B. in einem Fall gefunden eine Steigerung im Plasma von 0,151% auf 0,457%, gleichzeitig im Blute von 0,115% auf 0,418%. Hingegen fanden Lyttkens und Sandgren[2]) bei der Adrenalinvergiftung ein bedeutendes Ansteigen des Traubenzuckers des Serums ohne Vorhandensein eines gärbaren Körpers in den Blutkörperchen. Vielleicht ließe sich unser Fall als eine prämortale Sekretion des Zuckers aus den Blutkörperchen in das Plasma auffassen. Doch wollen wir uns zunächst jeder übereilten Deutung fernhalten.

Daß übrigens auch bei der alimentären Hyperglykämie zeitweise ein erheblicher Unterschied im Zuckergehalt innerhalb und außerhalb der Blutkörperchen möglich ist, ist in der erwähnten Arbeit von uns genügend hervorgehoben worden.

Über andere Tiere haben wir kein so ausgedehntes Versuchsmaterial. (Tabelle III.) Bei Katzen konnten wir in 3 Fällen

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 18, 375, 1909.

[2]) l. c.

bedeutende Mengen des rechtsdrehenden, vergärbaren Körpers auffinden. In einem vierten Fall waren die Blutkörperchen merkwürdigerweise frei von Zucker. — Entsprechend der früheren Angabe von Michaelis und mir fanden wir bei Kaninchen keinen oder nur geringe Mengen von Zucker. Der rechtsdrehende Körper erwies sich auch in 3 Fällen (von 4) als gärfähig. Weitere Versuche müssen die mangelnde Übereinstimmung mit den Befunden von Andersson und von Lyttkens und Sandgren aufklären.

Beim Menschen konnten wir in 3 Fällen nach der Gärung keine Rechtsdrehung konstatieren.

Tabelle III.

Versuch	Tierart	Gewicht g	Entnommene Blutmenge ccm	Blutkörperchen %	Plasma %	% Traubenzucker im Blut vor Gärung	Blut nach Gärung	Plasma vor Gärung	Plasma nach Gärung	% Traubenzucker in den Blutkörperchen
1	Katze	2500	60	31	69	0,260	–0,07	0,265	0,003	0,29
2	„	2000	75	29	71	0,355	–0,007	0,370	0,002	0,25
3	„	2500	80	29	71	0,354	0,00	0,432	0,00	0,225
4	„	2450	85	33	67	0,154	0,00	0,219	0,00	0,01
5	Kaninchen	2250	90	34	66	0,105	0,028	0,12	– 0,0017	—
6	„	1700	70	33	67	0,102	0,00	0,127	0,00	0,05
7	„	2300	45	32	68	0,150	0,001	0,202	0,00	0,04
8	„	1500	45	29	71	0,116	–0,002	0,166	0,00	0,00
9	Mensch (Epilepsie)		20	—	—	0,147	0,007 [1])	—	—	—
10	Mensch (Diabetes)		20	—	—	0,170	–0,01	—	—	—
11	Mensch		20	—	—	0,075	0,00	—	—	—

Das Vorkommen anderer zur Kohlenhydratgruppe gehörenden Körper, neben dem Traubenzucker, im Blute wird durch die vorliegenden Versuche natürlich nicht tangiert. Das gelegentliche Vorkommen eines linksdrehenden Körpers im Blute ist von P. Mayer u. a. sichergestellt, und auch Michaelis und ich haben im Laufe unserer Versuche nach der Gärung wieder-

[1]) Keine Reduktion.

holt eine Linksdrehung konstatieren können.[1]) Beim Hunde scheint allerdings dieser linksdrehende Körper nur selten vorzukommen.

Die getrennte Untersuchung des Plasmas und des Gesamtblutes auf den Zuckergehalt ist zweifellos von großer praktischer Wichtigkeit. C. v. Noorden[2]) wies zuerst auf die Unstimmigkeit zwischen der Zuckerausscheidung im Harn und dem Zuckergehalt des Blutes hin im Sinne einer „Zuckerdichtigkeit der Diabetikernieren". Michaelis und ich konnten in einigen Fällen auf solche Verhältnisse hinweisen,[3]) und auch von klinischer Seite ist das Problem in Angriff genommen worden.[4]) Die Verteilung des Zuckers auf Plasma und Blutkörperchen in diesen Fällen hat jedoch bis jetzt kaum eine Berücksichtigung erfahren. Jedenfalls liegt hier ein großes Feld der Forschung vor, das das Zusammenarbeiten vieler Kräfte nötig macht.

---

[1]) P. Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 518. — Lépine und Boulud, Compt. rend. 133, 138; 134, 398; 135, 139; 143, 500, 539. — Rona und Michaelis, l. c.

[2]) Noorden, Handb. d. Pathol. des Stoffw. von C. v. Noorden, 2. Aufl., 2, 1907. — Vgl. auch: Die Zuckerkrankheit, 4. Aufl., Berlin 1907, S. 91.

[3]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 18, 375, 1909.

[4]) Vgl. u. a. Mohr, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 4, 910, 1907.

Über die Ausscheidung von per os eingeführten Phosphaten, besonders der Calciumphosphate.

Von

Ragnar Berg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium in Dr. Lahmanns Sanatorium auf Weißer Hirsch bei Dresden.)

(Eingegangen am 22. November 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

Lange Zeit war das gesamte Wissensmaterial von den Mineralbestandteilen der tierischen Welt in unendlich viele, meist nur kleine und an sich sogar belanglose Notizen der chemischen, physiologischen und medizinischen Literatur zerstreut. In dieser Hinsicht befanden sich die Biochemiker, die sich mit dem Mineralaufbau der Pflanzen beschäftigen, in unendlich viel günstigerer Lage: sie hatten ein ziemlich beschränktes Literaturgebiet, das man mit gutem Willen noch ganz gut übersehen konnte. Von einer wirklichen Biochemie der tierischen Mineralbestandteile konnte also erst die Rede werden, als Albu und Neuberg die hierher gehörenden, sich auf den tierischen Organismus beziehenden Angaben sammelten und in ihrer „Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels" kritisch sichteten. Den Haupterfolg dieses Buches möchte ich darin suchen, daß durch diese erstmalige Zusammenfassung der bekannten Tatsachen erst so recht grell beleuchtet wurde, wie außerordentlich gering, geradezu gesagt, völlig gleich Null unser positives Wissen auf diesem Gebiete ist. Eben hierdurch bekam die Forschung auf diesem Gebiete einen gewaltigen Anstoß, wobei vor allem die Arbeit planmäßiger wurde und zum Teil schon gewisse Richtlinien für die folgenden Untersuchungen erkennen läßt. Es ist jedoch nicht zu bestreiten, daß das augenblickliche Streben oft noch viel Dilettantenhaftes

aufweist, was ja niemanden in Staunen setzen kann, wenn man bedenkt, daß hier gewöhnlich die Kenntnisse des Physiologen erst in Vereinigung mit chemischem Wissen und analytischer Schulung eine planmäßige und erfolgreiche Arbeit gewährleisten können. Besonders häufig versündigen sich diese Untersuchungen in drei Punkten.

Die erste Fehlerquelle bildet gewöhnlich das Versuchsmaterial. So weit Menschen hierfür in Betracht kommen, werden naturgemäß am häufigsten mehr oder weniger krankhafte oder degenerierte Medien benutzt, ein Material, wie es sich eben in den Krankenhäusern zusammenfindet. Daß die hierbei gewonnenen Resultate nur mit allergrößter Vorsicht verallgemeinert werden dürfen, sollte eigentlich selbstverständlich sein, wird jedoch nur äußerst selten berücksichtigt. Womöglich noch kritikloser wird gewöhnlich bei der Übertragung der Resultate von Tierversuchen auf Tiere anderer Spezies oder gar auf Menschen verfahren.[1]) Der zweite Fehler liegt in der Versuchsanordnung und beruht gewöhnlich auf mangelnder Kenntnis der schon auf demselben Gebiete geleisteten Arbeit. Nur so lassen sich z. B. solche Erscheinungen erklären, wie eine Reihe englischer Arbeiten, bei denen zur Untersuchung der diuretischen Wirkung des Calciums, Chlorcalcium in physiologischer Kochsalzlösung eingespritzt wird, obgleich längst feststeht, einerseits daß das Ca harntreibend wirkt, andererseits, daß Ca- und Na-Wirkungen sich gegenseitig aufheben. Der dritte Fehler liegt endlich in zu knappem Untersuchungsmaterial bei zu weitgehender oder zu einseitiger Schlußfolgerung. Beispiele sind Legion und wohl jedem geläufig!

Wenn diese drei jedem Biochemiker altbekannt sind, so möchte ich jetzt auf eine vierte Fehlerquelle aufmerksam machen. Im Grunde genommen ist der ursächliche Umstand bekannt, sogar oftmals experimentell erhärtet worden, und doch wird er in biochemischer Praxis wie in der Pharmakotherapie völlig übersehen. In jeder Toxikologie finden wir angegeben, daß die anorganischen Salze (je nach Dosis mehr oder minder ausgesprochene) Gifte sind oder, um nicht zu Mißverständnissen Veranlassung zu geben, im tierischen Organismus mindestens die Rolle von Fremdkörpern spielen, die möglichst schnell wieder ausgeführt werden. Da wir aber wissen, daß die Kationen vom Körper verwendet werden können, müssen wir die Ursache zu diesem Verhalten beim Anion suchen.

Unter den Abbauprodukten des tierischen Organismus finden wir organische, größtenteils sehr einfach gebaute Stoffe und vor allem anorganische Salze. Diese weiter abzubauen ist der Organismus nicht imstande; die von der Sonne den Pflanzen mitgeteilte Energie ist jetzt erschöpft. Die

[1]) Hierzu möchte ich auf die Arbeiten von E. Zunz verweisen (z. B. Recherches sur la Digestion de la viande crue de la viande cuites chez la chat. Brüssel 1910), die so recht darlegen, wie verschieden schon die Magenverdauung selbst bei Raubtieren sein kann.

Phosphorsäure, Schwefelsäure, Kohlensäure usw. des Bodens werden auf dem Umweg über die Pflanzen unter Aufnahme der von der Sonne in Form von Licht und Wärme gespendeten Energie zu Nuclein, Eiweiß, Kohlenhydraten und Fett aufgebaut, durch ihre Zerstörung im Tierkörper wird das tierische Leben indirekt mit Sonnenenergie gespeist, wobei die Energieträger wieder auf ihr ursprüngliches Potential, den anorganischen Zustand, zurücksinken und für das Tier unbrauchbar werden. Denn das ist ja gerade der einzige, uns jetzt bekannte prinzipielle Unterschied zwischen Pflanzen und Tieren, daß jene unter Aufspeicherung von Sonnenenergie gewisse anorganische Verbindungen zu organischen Stoffen synthetisieren können, während diese Fähigkeit den Tieren abzugehen scheint. Schon durch diese einfache Überlegung ergibt sich, daß die Anionen der anorganischen Salze keine Energiespender, kein Baumaterial für den tierischen Organismus sein können, sondern höchstens noch als Reizmittel, id est als Fremdkörper oder, allgemein gesprochen, als Gifte wirken.

Diese Überlegung wird auch durch das Experiment als richtig bestätigt. Aus einer Unzahl Untersuchungen geht direkt, gewöhnlicher noch indirekt hervor, daß die anorganischen Säuren nur als Reizmittel, als Fremdkörper wirken. Es ist trotz der mannigfachsten Versuche noch kein Fall einwandfrei nachgewiesen worden, wo Phosphorsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure oder Chlor vom tierischen Organismus als Baustein benutzt wurden, wohl aber bei allen Versuchen stets von neuem erwiesen, daß diese Anionen glatt aus dem Körper wieder, und zwar nicht als freie Säuren, sondern erst nach mehr oder minder vollkommener Absättigung (hauptsächlich durch anorganische Kationen) ausgeschieden wurden.

Diese Tatsache besitzt nun für den Biochemiker eine zweifache Bedeutung. Erstens ergibt sich daraus ohne weiteres das Unzulängliche aller Versuche, dem Körper durch anorganische Salze, soweit die Metalloide in Frage kommen, Bausteine für Nervensubstanz usw. beizubringen, d. h. die Ungereimtheit aller anorganischen sogenannten Nährsalzgemische, soweit ihre Anionen in Frage kommen. Des weiteren ergibt sich die Notwendigheit, beim Untersuchen der physiologischen Wirkungsweise der Kationen ihre Darreichungsform, also das mit ihnen gleichzeitig verabreichte Anion zu berücksichtigen. Um nun gleich auf mein Arbeitsgebiet zu kommen: bei Untersuchungen über die Wirkung und die Assimilisation des Calciums ist das gleichzeitig verabreichte Anion von größter Bedeutung.

Aus den Untersuchungen von v. Noorden und seinen Schülern wissen wir z. B., daß die Phosphorsäure bei dem normalen Stoffwechsel größtenteils durch die Dickdarmschleimhaut, und zwar als Tricalciumphosphat ausgeschieden wird, und daß durch Gaben von Calciumcarbonat die Harnphosphorsäure vermindert, dagegen Phosphorsäure und Kalk in den Faeces vermehrt werden. Schon hieraus konnte man sich denken, daß Gaben von Calciumphosphaten im Gegensatz zum Darreichen von Calciumcarbonat je nach der Absättigung der dargereichten Phosphor-

säure keine gesteigerte oder sogar eine verminderte Diurese herbeiführen würden. Tatsächlich erhielt Röse bei seinen Untersuchungen über die harntreibende Wirkung der Calciumsalze damit übereinstimmende Resultate. Beim tert. Calciumphosphat liegen die Verhältnisse insofern scheinbar etwas anders als bei den andern anorganischen Salzen, als diese Verbindung im Knochensystem vom Organismus als Baustein benutzt wird. Darauf fußend, haben schon unzählige Fabrikanten und Spekulanten anorganische Nährsalze zusammengestellt, die beim Verabreichen in die Blutbahn übergehen und dann einfach in den Knochen abgelagert werden sollten. Ein solches Präparat z. B., das schlechte Zähne verbessern soll, besteht aus aufgeschlossener Zahnsubstanz! So abgeschmackt solche Ideen dem Biochemiker auch vorkommen mögen, unter den praktizierenden Ärzten haben sie unendlich viele Anhänger und selbstverständlich noch mehr unter dem Laienpublikum.

Ich weiß wohl, daß das letzte Jahr gerade zwei Arbeiten gebracht hat, die darin gipfeln, daß der tierische Körper imstande sei, auch anorganische Phosphorsäure, wenn auch nur in ganz geringem Maße als Baustein zu benutzen. Aber in der einen dieser Arbeiten kommt der Autor nur auf Grund allzu großen Optimismus bei der Beurteilung seiner Versuchsergebnisse zu dieser Ansicht, die der unbefangene Leser mit bestem Willen nicht teilen kann. Und in der anderen Arbeit wird dieser Schluß durch einen Versuchsfehler möglich gemacht: der Verfasser hat übersehen, daß die Phosphorsäureausscheidung noch 3 bis 4 Tage nach dem Aussetzen der Phosphatzufuhr andauert, und sieht das so erhaltene Minus der Phosphorsäureausscheidung irrtümlich als vom Körper adsorbiert an.

Man könnte gegen meine oben skizzierte Anschauung noch die in Bonn neulich entdeckte Tatsache der Kohlensäureabsorption durch eine Schmetterlingspuppe anführen; ich habe leider die betreffende Originalarbeit nicht hier auftreiben können, bin infolgedessen unfähig, mir selbst einen Begriff von dem Wert dieser Arbeit als Beweismittel zu bilden. Ich möchte jedoch darauf hinweisen, daß wenigstens nach dem Referat, das ich gelesen habe, der Wasserabsorption der Puppe wohl nicht genügend Aufmerksamkeit geschenkt worden ist, und daß dies vielleicht die sonst rätselhafte Kohlensäureabsorption mit zu erklären imstande wäre.

Veranlassung zu vorstehenden Überlegungen gaben mir einige Erscheinungen in einer Arbeit von Carl Röse[1]). Hédon und Fleig[2]) hatten bekanntlich u. a. auch gefunden, daß dem Ca-Ion eine spezifische erregende Wirkung gegenüber dem Urether eigen ist, und daraus glaubte Röse schließen zu dürfen, daß die harntreibende Wirkung der kalkhaltigen, natronarmen Mineralwässer ebenfalls auf ihren Gehalt an Calciumionen zurückzuführen sei, wie ja auch nach den Arbeiten von v. Noorden und seinen Schülern anzunehmen sei. Um nun dies sicher-

[1]) C. Röse, Manuskript, 1909.

[2]) Hédon und Fleig, Archives internat. d. Physiol. 1905—1906.

zustellen, hat Röse an sich und vielen anderen Personen Versuche mit verschiedenen Kalksalzen gemacht, wobei er die ausgesprochen harntreibende Wirkung des Ca-Ions bestätigen konnte. Nur zwei Calciumsalze wichen in ihren Wirkungen von den andern ab: das Tri- und das Dicalciumphosphat; bei jenem war eine Einwirkung auf die Nierentätigkeit überhaupt nicht nachweisbar, bei diesem schien eher eine hemmende als eine fördernde Wirkung vorhanden zu sein. Ich habe damals zur Erklärung eben darauf hingewiesen, daß die eingeführte Phosphorsäure ja, wo möglich, stets als Tricalciumphosphat durch den Darm ausgeschieden wird, daß also durch das tatsächlich resorbierte Tricalciumphospat kein Calcium den Nieren zugeführt wird, oder genauer, daß, wenn Calcium als tertiäres Phosphat eingeführt, die Nieren hindurchpassiert, dann zur Ausscheidung der Posphorsäure ebensoviel Calcium, das sonst die Nieren hätte passieren sollen, nach dem Darme gelenkt wird. Vom sekundären Phosphate könnte man in gleicher Anschauungsweise erwarten, daß es wenigstens der Hauptsache nach als Tricalciumphosphat ausgeschieden werden würde; hierbei müßte der Organismus also noch Calcium zur Absättigung der überschüssig eingeführten Phosphorsäure hergeben. Hierdurch müßte ein Manko in der Calciumausfuhr durch die Nieren eintreten, wodurch wiederum die Nierentätigkeit beeinträchtigt werden müßte.

Als dann Dr. Lahmanns Sanatorium mir in dankenswerter Weise ein Laboratorium für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung stellte, wurde es meine erste Arbeit, eben den Ausscheidungsmechanismus der Phosphorsäure, besonders bei gleichzeitiger Zufuhr von Calcium zu untersuchen, und die Resultate folgen jetzt hier. Aber zuerst etwas über die Versuchsbedingungen.

Kalkpräparate werden, besonders in Form von Phosphaten, bekanntlich vor allem bei Rachitis und ähnlichen Erkrankungen der starren Gewebe, weiter zur Vermehrung der harnsäurelösenden Eigenschaften des Harns bei Gicht (v. Noorden, der jedoch das Carbonat bevorzugt), endlich auch bei Neurasthenie und Tuberkulose gegeben. Das sind nun Krankheiten, wo man also wenigstens einen Kalkmangel voraussetzt, jedenfalls möglichst Kalk und Phosphorsäure zum Ansatz bringen will. Im vorhergehenden habe ich schon auf jedem Biochemiker geläufige Arbeiten hingewiesen, die mit zumindest an vollkommene Gewißheit grenzender Wahrscheinlichkeit dartun, daß die anorganischen Phosphorsäuren höchstens als Reizmittel, nicht als Bausteine für den Organismus in Betracht kommen. Es blieb mir nur übrig nachzuforschen, ob wenigstens das Calcium dieser Verbindungen zum Ansatz gelangen könnte. Dazu war es nötig, einen Organismus als Versuchsobjekt zu bekommen, der gesunde Verdauungsorgane besaß und doch möglichst kalkarm war. Da man aber einem kranken Organismus die Strapazen solcher Versuche nicht zumuten konnte, mußte ich versuchen, beim ge-

sunden Menschen durch eine besondere Diät die Calciumreserven wegzuschaffen. Und da es weiter unmöglich war, eine andere Versuchsperson aufzutreiben, die die strenge Regelmäßigkeit und Selbstkontrolle einer vierteljährigen Versuchsreihe auf sich laden wollte, mußte ich mich selbst dazu hergeben. Ich bin, oder richtiger, war beim Anfang der Versuche vollkommen gesund, sowie ein Chemiker es sein kann, lebte sehr mäßig und vernünftig und besaß demnach voraussichtlich einen ziemlich großen Reservevorrat an Calcium, der also zuerst entfernt werden mußte. Danach wurde die Diät eingerichtet.

Aus Erfahrung wußte ich, daß jeder Versuch mit einem Calciumpräparat mindestens 5 bis 6 Tage dauern müßte, wenn man eine entscheidende Wirkung erzielen wollte. Weiter ist ja bekannt, daß erstens der Organismus Calcium überhaupt zurückzubehalten bestrebt ist, und zweitens die Phosphorsäureausscheidung durch den Darm der Versuchsperiode um mehrere Tage nachhinkt. Also mußte die stets auf 7 Tage festgesetzte Darreichung der verschiedenen Substanzen von einer der Einfachheit und Sicherheit halber ebenfalls 7tägigen Nachperiode bei sonst genau gleicher Lebensweise, aber ohne Extrazufuhr von Phosphaten ergänzt werden. Infolgedessen stellte ich mir einen Speisezettel für eine Woche zusammen, der dann Woche für Woche wiederkehrte und nur in ganz unwesentlichen Teilen variiert werden durfte. Aus eben angegebenen Gründen wählte ich eine Fleischdiät, durch die dem Körper verhältnismäßig wenig Phosphorsäure, aber ganz unverhältnismäßig wenig Calcium und Magnesium zugeführt wurde. Die während der Versuchsdauer dem Organismus einverleibten Nährstoffe sind in der Tabelle I zusammengestellt. Daß auch sonst, besonders in Arbeit, Bewegung usw. während der Versuchszeit die größtmögliche Gleichmäßigkeit beobachtet wurde, brauche ich wohl nicht besonders zu betonen.

Wie man aus der Tabelle I sehen kann, waren die Nährstoffmengen vollkommen hinreichend, zum Teil sogar, besonders was Eiweiß betrifft, etwas größer, als ich sonst zu mir zu nehmen gewohnt bin. Trotzdem ging mein seit 5 Jahren stationär gebliebenes Körpergewicht im Verlauf der Versuche sehr schnell herunter. Ich kann hierfür keine andere Erklärung finden, als die schon von Lahmann hinsichtlich Fleischkost gegebene: bei dieser Art der Ernährung werden dem Organismus so viel Anionen (HPO_4'', SO_4'') einverleibt, daß die gleichzeitig angeführten Kationen nach der Verbrennung der organischen Substanz seitens des Organismus nicht zur Neutralisation der wieder auszuführenden Anionmenge genügten. Wie wir wissen, hat der Organismus ein Schutzmittel gegen eine solche drohende Acidosis in der Fähigkeit, nach Bedarf Ammoniak produzieren zu können. Außerdem kann ein Teil der Schwefelsäure als Estersäure, also auf Kosten organischer Substanz schon halbgesättigt ausgeschieden werden. Aber die Anwendung dieses Mittels bedingt eben eine Einschmelzung von Muskelsubstanz, die wohl durch eine anormale Oxydation, bedingt durch die allmählich anormal werdende Zusammensetzung der Körpersäfte, verursacht wird. Daß diese Erklärung wohl zutreffend sein mag, geht aus dreierlei hervor.

Tabelle I.

Aufgenommene Nahrung.

Menge	Substanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
I. Periode: 15. III. bis 22. III. Vorperiode. Anfangsgewicht: 82 kg.								
4900 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1828	0,0539	—	—
85 „	Milch	3,13	3,14	4,13	0,1403	0,0119	0.2584	59,84
900 „	Weißwein[1]) .	1,98	—	1,80	0,0639	0,0918	0,3024	530,46
250 „	Bier	0,60	—	2,69	0,0120	0,0080	0,1368	118,75
1650 g	Weißbrot . .	206,75	66,60	868,40	0,4521	0,1452	4,9170	5134,80
540 „	Hörnchen . .	47,52	48,98	480,15	0,1836	0,0180	2,8188	2136,60
450 „	Honigbiskuits	64,80	30,60	281,70	0,0786	0,0660	1,0146	1710,00
410 „	Schinken . .	101,43	149,45	—	0,2665	0,1669	0,7507	1798,60
410 „	Zunge	109,67	129,60	—	0,0972	0,0353	3,3259	1274,58
940 „	Rindfleisch .	192,70	26,32	—	0,1195	0,1889	7,9082	1504,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
950 „	Kartoffel . .	18,91	1,40	198,17	0,1644	0,1758	1,7271	840,75
100 „	Nudeln . . .	10,88	0,62	75,45	0,0146	0,0000	0,1884	336,10
125 „	Reis	10,00	1,30	96,52	0,0130	0,0241	0,3071	412,88
5 „	Fleischextrakt	0,32	0,01	—	0,0054	0,0172	0,4405	—
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
135 „	Zucker . . .	—	—	132,30	—	—	—	512,60
175 „	Bonbons[2]) . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	772,55	548,33	2586,65	1,8004	1,0040	24,1908	18930,68
II. Periode: 23. III. bis 29. III. Tricalciumphosphat. Anfangsgewicht: 81 kg.								
4500 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1679	0,0495	—	—
110 „	Milch	3,80	3,81	5,35	0,1815	0,0154	0,3344	77,44
275 „	Weißwein . .	0,61	—	0,55	0,0195	0,0281	0,0930	162,09
800 „	Bier	1,92	—	8,60	0,0384	0,0256	0,6936	380,00
1165 g	Weißbrot . .	145,97	51,73	613,14	0,3197	0,1027	3,4677	3656,60
600 „	Hörnchen . .	52,80	54,42	533,50	0,2040	0,0200	3,1320	2374,00
375 „	Honigbiskuits	54,00	25,50	234,75	0,0655	0,0550	0,8455	1425,00
410 „	Schinken . .	101,43	149,45	—	0,2665	0,1669	0,7507	1798,60
510 „	Zunge	133,98	161,21	—	0,1209	0,0438	4,1371	1668,38
400 „	Rindfleisch .	82,00	11,20	—	0,0508	0,0804	3,3652	640,00
150 „	Huhn	29,08	2,13	—	0,0233	0,0261	0,7416	195,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
450 „	Kartoffel . .	8,96	0,68	93,87	0,0779	0,0833	0,8181	398,25
300 „	Reis	24,00	3,12	231,66	0,0312	0,0579	0,7371	990,90
200 „	Nudeln . . .	21,76	1,24	150,90	0,0292	—	0,3768	672,20
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	664,09	554,79	2420,42	1,5963	0,7547	19,5803	17395,75
III. Periode: 30. III. bis 5. IV. $Ca_3P_2O_8$-Nachperiode. Anfangsgewicht: $79^1/_2$ kg.								
3300 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1231	0,0363	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2280	52,80
325 „	Wein	0,72	—	0,65	0,0231	0,0332	0,1099	191,56
1850 „	Bier	4,44	—	19,89	0,0888	0,0592	1,6040	878,75

[1]) Als Weingelee.

[2]) Mit Fruchtaroma, statt Obst!

Tabelle I (Fortsetzung).

Menge	Substanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
1350 g	Weißbrot . .	169,16	59,94	710,71	0,3699	0,1188	4,0230	4201,20
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
525 „	Honigbiskuits	75,60	35,70	328,65	0,0917	0,0770	1,1837	1995,00
360 „	Schinken . .	89,64	131,22	—	0,2340	0,1465	0,6592	1579,32
430 „	Zunge	104,53	135,92	—	0,1019	0,0290	3,4881	1353,34
600 „	Rindfleisch .	123,00	16,80	—	0,0762	0,1206	5,0478	960,00
250 „	Huhn	49,30	3,55	—	0,0388	0,0502	2,1033	325,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
100 „	Nudeln . . .	10,88	0,62	75,45	0,0146	—	0,1884	336,10
700 „	Kartoffel . .	13,93	1,05	142,52	0,1211	0,1295	1,2726	619,50
225 „	Reis	18,00	2,34	173,75	0,0234	0,0434	0,5528	743,18
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	702,61	518,14	2376,96	1,5797	0,8692	22,7481	17856,51

IV. Periode: 6. IV. bis 12. IV. Dicalciumphosphat.
Anfangsgewicht: $78^1/_2$ kg.

5000 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1725	0,0550	—	—
85 „	Milch	3,13	3,14	4,13	0,1403	0,0119	0,2584	59,84
400 „	Weißwein . .	0,88	—	0,80	0,0284	0,0408	0,1352	235,76
1300 „	Bier	3,12	—	13,98	0,0624	0,0416	1,1271	617,50
1350 g	Weißbrot . .	169,16	59,94	710,71	0,3699	0,1188	4,0230	4201,20
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
525 „	Honigbiskuits	75,60	35,70	328,65	0,0917	0,0770	1,1837	1995,00
400 „	Schinken . .	98,96	145,80	—	0,2600	0,1628	0,7324	1754,80
390 „	Zunge	94,81	123,28	—	0,0924	0,0335	3,1636	1195,82
750 „	Rindfleisch .	153,75	21,00	—	0,0952	0,1508	6,3098	1200,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
750 „	Kartoffel . .	14,93	1,13	156,45	0,1298	0,1388	1,3635	663,75
150 „	Reis	12,00	1,56	115,83	0,0156	0,0290	0,3686	495,45
100 „	Nudeln . . .	10,88	0,62	75,45	0,0146	—	0,1884	336,10
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
120 „	Zucker . . .	—	—	117,60	—	—	—	455,64
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	678,04	520,57	2342,39	1,6221	0,8750	21,1410	17432,93

V. Periode: 13. IV. bis 19. IV. $CaHPO_4$-Nachperiode.
Anfangsgewicht: $77^1/_4$ kg.

4200 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1567	0,0462	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2280	52,80
425 „	Weißwein . .	0,94	—	0,85	0,0302	0,0434	0,1437	250,50
3500 „	Bier	8,40	—	37,63	0,1680	0,1120	3,0345	1662,50
1450 g	Weißbrot . .	181,69	64,38	763,14	0,3973	0,1276	4,3210	4512,40
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
450 „	Honigbiskuits	64,80	30,60	281,70	0,0786	0,0660	1,0146	1710,00
575 „	Schinken . .	142,26	209,59	—	0,3738	0,2340	1,0528	2522,53
500 „	Zunge	121,55	158,05	—	0,1185	0,0430	4,0560	1621,00
500 „	Rindfleisch .	102,50	14,00	—	0,0635	0,1005	4,2065	800,00

Tabelle I (Fortsetzung).

Menge	Substanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
105 g	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
750 „	Kartoffel . .	14,93	1,13	156,45	0,1298	0,1388	1,3635	663,75
75 „	Reis	6,00	0,78	57,92	0,0078	0,0145	0,1843	247,73
125 „	Nudeln . . .	13,60	0,78	94,31	0,0183	—	0,2355	420,35
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	700,08	610,31	2317,34	1,8156	0,9515	22,1277	19084,32
VI. Periode: 20.VI. bis 26.IV. Calciumhypophosphit. Anfangsgewicht: $76^3/_4$ kg.								
5400 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,2014	0,0594	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2280	52,80
650 „	Wein	1,43	—	1,30	0,0462	0,0663	0,2197	383,11
500 „	Bier	1,20	—	5,38	0,0240	0,0160	0,4335	237,50
1350 g	Weißbrot . .	169,16	59,94	710,71	0,3699	0,1188	4,0230	4201,20
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
300 „	Honigbiskuits	43,20	20,40	187,80	0,0524	0,0440	0,6764	1140,00
580 „	Schinken . .	143,49	211,41	—	0,3770	0,2361	1,0620	2544,46
450 „	Zunge	101,40	142,25	—	0,1067	0,0387	3,6504	1432,10
500 „	Rindfleisch .	102,50	14,00	—	0,0635	0,1005	4,2065	800,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
750 „	Kartoffel . .	14,93	1,13	156,45	0,1298	0,1388	1,3635	663,75
125 „	Reis	10,00	1,30	96,52	0,0130	0,0241	0,3071	412,88
125 „	Nudeln . . .	13,60	0,78	94,31	0,0183	—	0,2355	420,35
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
135 „	Zucker . . .	—	—	132,30	—	—	—	512,60
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	644,32	582,21	2207,21	1,6753	0,8682	18,6929	17022,82
VII. Periode: 27.IV. bis 3.V. $Ca(H_2PO_2)_2$-Nachperiode. Anfangsgew.: $76^3/_4$ kg.								
5300 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1977	0,0583	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2288	52,80
325 „	Weißwein . .	0,72	—	0,65	0,0231	0,0332	0,1099	191,56
1850 „	Bier	4,44	—	19,89	0,0888	0,0592	1,6040	878,75
1350 g	Weißbrot . .	169,16	59,94	710,71	0,3699	0,1188	4,0230	4201,20
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
300 „	Honigbiskuits	43,20	20,40	187,80	0,0524	0,0440	0,6764	1140,00
410 „	Schinken . .	101,43	149,45	—	0,2665	0,1669	0,7507	1798,60
530 „	Zunge	128,84	167,53	—	0,1256	0,0456	4,2993	1747,14
575 „	Rindfleisch .	117,88	16,10	—	0,0730	0,1156	4,8375	920,00
100 „	Huhn	19,72	1,42	—	0,0155	0,0174	0,4944	130,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
700 „	Kartoffel . .	13,93	1,05	142,52	0,1211	0,1295	1,2726	619,50
200 „	Reis	16,00	2,08	154,44	0,0208	0,0386	0,4914	660,60
125 „	Nudeln . . .	13,60	0,78	94,31	0,0183	—	0,2355	420,35
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	672,33	549,75	2235,66	1,6458	0,8526	21,3100	17381,26

Tabelle I (Fortsetzung).

Menge	Subetanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
VIII. Periode: 4. V. bis 10. V. Lecithin. Anfangsgewicht: $75^1/_2$ kg.								
4500 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1679	0,0165	—	—
80 „	Milch	2,76	2,77	3,89	0,1320	0,0112	0,2432	56,32
875 „	Weißwein . .	1,93	—	1,75	0,0621	0,0893	0,2958	551,73
1600 „	Bier	3,84	—	17,20	0,0768	0,0512	1,3872	760,00
1325 g	Weißbrot . .	166,02	58,83	697,35	0,3631	0,1166	3,9485	4279,00
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
300 „	Honigbiskuits	43,20	20,40	187,80	0,0524	0,0440	0,6764	1140,00
370 „	Schinken . .	91,54	134,87	—	0,2405	0,1506	0,6775	1623,90
655 „	Zunge	159,24	207,05	—	0,1552	0,0563	5,3133	2239,39
700 „	Rindfleisch .	143,50	19,60	—	0,0889	0,1407	5,8891	1120,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
750 „	Kartoffel . .	14,93	1,13	156,45	0,1298	0,1388	1,3635	663,75
125 „	Nudeln . . .	13,60	0,78	94,31	0,0183	—	0,2355	420,35
125 „	Reis	10,00	1,30	96,52	0,0130	0,0241	0,3071	412,88
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	691,38	575,13	2176,96	1,6493	0,8543	22,6244	17888,08
IX. Periode: 11. V. bis 17. V. Lecithin-Nachperiode. Anfangsgewicht: $75^1/_4$ kg.								
4250 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1525	0,0468	—	—
85 „	Milch	3,13	3,14	4,13	0,1403	0,0119	0,2584	59,84
425 „	Weißwein . .	0,94	—	0,85	0,0302	0,0434	0,1437	250,50
1550 „	Bier	3,72	—	16,66	0,0744	0,0496	1,3439	736,25
1175 g	Weißbrot . .	147,23	52,17	618,40	0,3220	0,1034	3,5015	3656,60
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
300 „	Honigbiskuits	43,20	20,40	187,80	0,0524	0,0440	0,6764	1140,00
445 „	Schinken . .	110,09	162,20	—	0,2893	0,1811	0,8148	1952,22
670 „	Zunge	162,88	211,79	—	0,1488	0,0576	5,4350	2298,46
275 „	Rindfleisch .	56,38	7,70	—	0,0349	0,0553	2,3136	440,00
250 „	Huhn	49,30	3,55	—	0,0388	0,0435	1,2360	325,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
600 „	Kartoffel . .	11,94	0,90	125,16	0,1038	0,1110	1,0908	531,00
275 „	Nudeln . . .	29,92	1,71	207,49	0,0402	—	0,5181	924,28
125 „	Reis	10,00	1,30	96,52	0,0130	0,0241	0,3071	412,88
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	669,47	593,25	2178,56	1,5834	0,7857	19,9192	17345,72
X. Periode: 18. V. bis 24. V. Lecithin-Calciumlactat. Anfangsgewicht: 75 kg.								
4550 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1697	0,0501	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2280	52,80
300 „	Weißwein . .	0,66	—	0,60	0,0213	0,0306	0,1014	176,82
600 „	Bier	1,44	—	6,45	0,0288	0,0192	0,5202	285,60
1350 g	Weißbrot . .	169,16	59,94	710,71	0,3699	0,1188	4,0230	4201,20
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40

Tabelle I (Fortsetzung).

Menge	Substanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
375 g	Honigbiskuits	54,00	25,50	234,75	0,0655	0,0550	0,8455	1425,00
545 „	Schinken . .	134,83	198,65	—	0,3543	0,2218	0,9979	2390,92
655 „	Zunge	159,23	207,05	—	0,1552	0,0563	5,3133	2239,39
450 „	Rindfleisch .	92,25	11,60	—	0,0575	0,0905	3,7859	720,00
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
900 „	Kartoffel . .	17,91	1,35	187,75	0,1557	0,1665	1,6362	796,50
75 „	Reis	6,00	0,78	57,92	0,0078	0,0145	0,1843	247,73
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
5 „	Fleischextrakt	0,32	0,01	—	0,0054	0,0172	0,4405	—
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	679,21	635,88	2123,52	1,6642	0,8660	20,3635	17156,12

XI. Periode: 25. V. bis 31. V. Lecithin-Calciumlactat-Nachperiode.
Anfangsgewicht: 75 kg.

3900 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,1417	0,0418	—	—
75 „	Milch	2,59	2,60	3,65	0,1238	0,0105	0,2280	52,80
925 „	Weißwein . .	2,04	—	1,85	0,0657	0,0944	0,3127	544,20
1950 „	Bier	4,68	—	20,96	0,0936	0,0624	1,6907	926,25
1425 g	Weißbrot . .	178,55	63,27	749,98	0,3905	0,1254	4,2465	4434,60
420 „	Hörnchen . .	36,96	38,09	373,45	0,1428	0,0140	2,1924	1661,40
375 „	Honigbiskuits	54,00	25,50	234,75	0,0655	0,0550	0,8455	1425,00
450 „	Schinken . .	111,33	164,03	—	0,2925	0,1832	0,8240	1974,15
565 „	Zunge	137,35	178,60	—	0,1339	0,0486	4,5832	1884,97
925 „	Rindfleisch .	189,63	25,90	—	0,1175	0,1859	7,7820	1828,60
105 „	Butter . . .	—	90,30	—	—	—	—	799,50
750 „	Kartoffel . .	14,93	1,13	156,45	0,1298	0,1388	1,3635	663,75
125 „	Nudeln . . .	13,60	0,78	94,31	0,0183	—	0,2355	420,35
90 „	Reis	7,20	0,94	69,50	0,0094	0,0174	0,2211	297,27
5 „	Zwiebel . . .	0,08	0,01	0,14	0,0065	0,0010	0,0074	2,07
105 „	Zucker . . .	—	—	102,90	—	—	—	398,69
175 „	Bonbons . . .	—	—	166,25	—	—	—	651,70
350 „	Honig	3,78	—	278,95	—	—	0,0875	1107,40
	Zusammen:	756,72	591,15	2253,14	1,7315	0,9784	24,6300	19072,70

XII. Periode: 1. VI. bis 14. VI. Calciumlactat.
Anfangsgewicht: 74 kg.

10100 ccm	Wasser . . .	—	—	—	0,3767	0,1111	—	—
145 „	Milch	5,00	5,02	7,05	0,2393	0,0203	0,4408	1020,80
850 „	Weißwein . .	1,87	—	1,70	0,0604	0,0867	0,2873	500,99
5600 „	Bier	13,44	—	60,20	0,2688	0,1792	4,9056	2660,00
2675 g	Weißbrot . .	335,18	118,77	1407,85	0,7330	0,2354	7,9715	8324,60
840 „	Hörnchen . .	73,92	76,18	746,90	0,2856	0,0280	4,3848	3322,80
525 „	Honigbiskuits	75,60	35,70	328,56	0,0917	0,0770	1,1837	1995,00
905 „	Schinken . .	199,16	293,42	—	0,5233	0,3276	1,4740	3531,54
1690 „	Zunge	410,84	534,21	—	0,4006	0,1453	9,2882	5975,22
975 „	Rindfleisch .	199,88	27,30	—	0,1238	0,1960	8,2027	1560,00
5 „	Fleischextrakt	0,32	0,01	—	0,0054	0,0172	0,4405	—
210 „	Butter . . .	—	180,60	—	—	—	—	1599,00

Tabelle I (Fortsetzung).

Menge	Substanz	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
1775 g	Kartoffel .	35,32	2,66	370,27	0,3071	0,3284	3,2270	1570,88
300 „	Nudeln . .	32,64	1,86	226,35	0,0438	—	0,5652	1008,30
75 „	Reis . . .	6,00	0,78	57,92	0,0078	0,0145	0,0074	247,74
210 „	Zucker . .	—	—	205,80	—	—	—	797,38
350 „	Bonbons . .	—	—	332,50	—	—	—	1303,40
700 „	Honig . . .	7,56	—	557,90	—	—	0,1750	2214,80
	Zusammen:	1396,73	1276,51	4303,09	3,4673	1,7667	42,5537	37632,45

Tabelle II.

Durchschnittliche Tagesaufnahme.

	Eiweiß g	Fett g	Kohlenhydrate g	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g	Reine Calorien
I. Vorperiode . .	96,57	68,54	323,33	0,2251	0,1255	3,0239	2366,33 (2285,08)
II. $Ca_3P_2O_8$	94,87	79,26	345,77	0,2280	0,1078	2,7972	2485,11 (2407,67)
III. Nachperiode . .	100,37	74,02	339,57	0,2257	0,1242	3,2497	2550,93 (2398,03)
IV. $CaHPO_4$	96,86	74,37	334,63	0,2317	0,1250	3,0201	2490,42 (2368,52)
V. Nachperiode . .	100,01	87,19	331,05	0,2594	0,1331	3,1611	2726,33 (2567,33)
VI. $Ca(H_2PO_2)_2$ . .	92,05	83,17	315,32	0,2393	0,1240	2,6704	2431,83 (2350,32)
VII. Nachperiode . .	96,05	78,54	319,38	0,2351	0,1218	3,0443	2483,04 (2330,28)
VIII. Lecithin	98,77	82,16	310,99	0,2356	0,1220	3,2321	2555,44 (2368,05)
IX. Nachperiode . .	95,64	84,75	311,22	0,2262	0,1122	2,8456	2477,96 (2337,00)
X. Lecithin+Ca-lact.	97,03	90,84	303,36	0,2377	0,1237	2,9091	2450,87 (2384,90)
XI. Nachperiode . .	108,10	84,45	321,88	0,2474	0,1398	3,5186	2724,67 (2514,61)
XII. Ca-lactat . . .	99,77	91,18	307,36	0,2477	0,1262	3,0394	2688,03 (2462,25)
Gesamtdurchschnitt:	98,12	82,13	320,89	0,2373	0,1242	3,0422	2555,12 (2401,75)

Die eingeklammerten Zahlen bedeuten reine Calorien aus der alkoholfreien Nahrung!

Tabelle III.

Ausgeschieden wurde:									
durch Harn:						durch Kot:			
Datum	Menge ccm	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	Gesamt-HPO_4'' g	Präformierte HPO_4'' g	Datum	$Ca^{\cdot\cdot}$ g	$Mg^{\cdot\cdot}$ g	HPO_4'' g
I. Periode. Vorperiode vom 15. III. bis 22. III.									
15. III.	830	0,1365	0,1250	2,7006	—	17. III.	0,6710	0,2482	1,8839
16. „	735	0,1530	0,1167	2,4117	—	21. „	0,7906	0,3421	3,9812
17. „	795	0,1306	0,0861	2,0304	—	23. „	0,9811	0,5082	7,4572
18. „	740	0,1555	0,0936	2,0761	—		—	—	—
19. „	1000	0,1992	0,1252	2,5296	—		—	—	—
20. „	1000	0,0983	0,0562	1,5174	—		—	—	—
21. „	1370	0,1471	0,1020	1,8863	—		—	—	—
22. „	675	0,3653	0,3207	1,9451	—		—	—	—
	7145	1,3855	1,0255	17,0972	—		2,4427	1,0985	13,3223
II. Periode. Täglich 6,2 g $Ca_3P_2O_8$ vom 23. III. bis 29. III.									
23. III.	780	0,1812	0,1130	2,4692	—	28. III.	4,1329	0,4836	7,7625
24. „	925	0,1576	0,1024	2,5647	—	29. „	3,0924	0,2521	4,6372
25. „	860	0,1758	0,0749	2,5725	—	1. IV. a	5,4923	0,4260	8,3556
26. „	945	0,1823	0,0875	3,1042	—		—	—	—
27. „	1075	0,1565	0,0761	3,1075	—		—	—	—
28. „	925	0,1247	0,0763	2,4410	—		—	—	—
29. „	765	0,1347	0,1091	2,7838	—		—	—	—
	6275	1,1128	0,6393	19,0429	—		12,7176	1,1617	20,6653
III. Periode. Nachperiode vom 30. III. bis 5. IV.									
30. III.	835	0,1430	0,0963	2,3699	—	1. IV. b	1,6502	0,1956	2,7887
31. „	770	0,1283	0,0745	1,9489	—		—	—	—
1. IV.	735	0,1387	0,0874	2,2847	—	5. IV.	1,9892	0,3791	5,8838
2. „	815	0,1414	0,0691	1,9446	—	11. IV. a	0,9898	0,3604	5,2610
3. „	700	0,1178	0,0690	2,1272	—		—	—	—
4. „	695	0,1246	0,0936	2,1246	—		—	—	—
5. „	700	0,1215	0,1169	2,3363	—		—	—	—
	5250	0,9153	0,6068	15,1362	—		4,6292	0,9351	13,9335
IV. Periode. Täglich 10,3 g $CaHPO_4$, 2 aq. vom 6. IV. bis 12. IV.									
6. IV.	845	0,1506	0,0975	2,8159	—	11. IV. b	3,3496	0,4804	7,2285
7. „	725	0,1221	0,0788	2,9424	—		—	—	—
8. „	800	0,1464	0,0844	4,3970	—	12. IV.	7,1412	0,5121	13,4248
9. „	730	0,1714	0,0945	4,8587	—	14. „	5,0500	0,3627	9,2206
10. „	725	0,1038	0,0521	3,5621	—	15. IV. a	2,2401	0,1808	4,4411
11. „	515	0,1576	0,0982	4,5818	—		—	—	—
12. „	685	0,1380	0,0880	3,3773	—		—	—	—
	5055	0,9899	0,5935	26,5352	—		17,7809	1,5360	34,3150

Tabelle III (Fortsetzung).

Ausgeschieden wurde: durch Harn: Datum	Menge ccm	$Ca^{..}$ g	$Mg^{..}$ g	Gesamt-HPO_4'' g	Präformierte HPO_4'' g	durch Kot: Datum	$Ca^{..}$ g	$Mg^{..}$ g	HPO_4'' g
V. Periode. Nachperiode vom 13. IV. bis 19. IV.									
13. IV.	685	0,1324	0,0814	2,1647	—	15. IV. b	2,0956	0,2098	4,2954
14. „	690	0,1203	0,0781	2,4744	—		—	—	—
15. „	885	0,1496	0,0991	2,6949	—	16. IV.	1,3113	0,3051	3,8063
16. „	995	0,1455	0,0733	3,0001	—	18. „	0,5108	0,4082	3,6523
17. „	830	0,1271	0,0798	2,4483	—	22. IV. a	0,5234	0,2958	2,3973
18. „	685	0,0924	0,0691	2,3382	—		—	—	—
19. „	845	0,1179	0,0850	2,3677	—		—	—	—
	5615	0,8852	0,5658	17,4883	—		4,4411	1,2189	14,1513
VI. Periode. Täglich 10,2 g $Ca(H_2PO_2)_2$ vom 20. IV. bis 26. IV.									
20. IV.	1025	0,1925	0,1252	5,3876	2,7508	22. IV. b	0,9153	0,2607	2,1277
21. „	1800	0,2202	0,1930	17,5012	2,4123		—	—	—
22. „	1335	0,3033	0,1001	14,5837	2,5396	24. IV.	5,8771	0,5679	4,7330
23. „	1305	0,2820	0,0932	14,3467	3,5418	27. „	3,6729	0,3004	2,4742
24. „	1170	0,2634	0,0907	12,4912	2,7158	29. IV. a	3,1299	0,2442	2,0696
25. „	1095	0,2883	0,1036	12,2669	2,7663		—	—	—
26. „	1285	0,3381	0,1087	14,0332	2,6490		—	—	—
	9015	1,8878	0,8145	90,6105	19,3756		13,5952	1,3732	11,4045
VII. Periode. Nachperiode vom 27. IV. bis 3. V.									
27. IV.	1090	0,1739	0,0661	4,5807	2,9538	29. IV. b	1,1828	0,1247	1,0100
28. „	895	0,1825	0,0947	2,3156	2,3160		—	—	—
29. „	790	0,1196	0,0501	1,0710	—	1. V.	3,0847	0,5552	7,3458
30. „	815	0,1524	0,0914	1,6547	—	4. „	0,5952	0,3646	2,1117
1. V.	(1415)	0,1485	0,0877	1,9403	—	8. V. a	0,3310	0,2112	1,3090
2. „	875	0,3495	0,1185	1,8737	—		—	—	—
3. „	895	0,1244	0,0738	1,7140	—		—	—	—
	6775	1,2508	0,5823	15,1500	5,2698		5,1937	1,2557	11,7765
VIII. Periode. Täglich 5,35 g Lecithin vom 4. V. bis 10. V.									
4. V.	1450	0,1060	0,0611	1,8892	—	8. V. b	0,3700	0,3963	2,6883
5. „	1345	0,0911	0,0735	2,1037	—		—	—	—
6. „	960	0,1045	0,0845	2,6020	—	10. V.	0,6994	0,4569	2,7009
7. „	1755	0,1026	0,0895	3,3085	—	12. „	0,2358	0,1368	0,9132
8. „	1310	0,0963	0,0929	3,6433	—		—	—	—
9. „	1185	0,0873	0,0997	2,5213	—		—	—	—
10. „	960	0,1242	0,0884	2,8596	—		—	—	—
	8965	0,7120	0,5896	18,9276	—		1,3052	0,9900	6,3024

Tabelle III (Fortsetzung).

Ausgeschieden wurde:									
durch Harn:						durch Kot:			
Datum	Menge ccm	$Ca^{..}$ g	$Mg^{..}$ g	Gesamt-HPO_4'' g	Präformierte HPO_4'' g	Datum	$Ca^{..}$ g	$Mg^{..}$ g	HPO_4'' g
IX. Periode. Nachperiode vom 11. V. bis 17. V.									
11. V.	1125	0,1424	0,0718	2,4123	—	16. V.	0,6213	0,3531	2,3434
12. „	960	0,1004	0,0926	2,5369	—	18. „	0,8861	0,5322	3,3714
13. „	1060	0,1304	0,0970	2,2307	—	20. „	0,5133	0,2687	2,5005
14. „	895	0,0954	0,0841	1,8836	—	21. „	0,4038	0,1765	1,7220
15. „	875	0,1040	0,0786	1,8808	—		—	—	—
16. „	860	0,0944	0,0705	2,3599	—		—	—	—
17. „	790	0,0815	0,0666	2,5262	—		—	—	—
	6565	0,7485	0,5612	15,8304	—		2,4245	1,3305	9,9373
X. Periode. Täglich 5,35 g Lecithin und 3,00 g Calciumlactat vom 18.V. bis 24.V.									
18. V.	625	0,0917	0,0820	1,9763	—	23. V.	1,6726	0,4626	4,0000
19. „	740	0,1158	0,0847	2,9404	—	26. „	1,7351	0,4787	4,3271
20. „	725	0,1097	0,0692	2,1712	—	28. „	1,3789	0,5029	4,1968
21. „	800	0,1179	0,0879	3,7112	—		—	—	—
22. „	945	0,1312	0,0823	3,6485	—		—	—	—
23. „	910	0,1533	0,0998	2,3727	—		—	—	—
24. „	780	0,1508	0,0955	2,0539	—		—	—	—
	5625	0,8704	0,6014	18,8742	—		4,7866	1,4442	12,5239
XI. Periode. Nachperiode vom 25. V. bis 31. V.									
25. V.	1095	0,1385	0,0932	2,5596	—	1. VI.	0,1701	0,0881	0,6032
26. „	1090	0,1594	0,0991	2,4677	—	2. „	0,6650	0,4604	3,3643
27. „	935	0,1517	0,1013	2,6088	—	3. „	0,5847	0,2345	2,1840
28. „	895	0,1683	0,0889	2,3072	—		—	—	—
29. „	1000	0,1210	0,0882	2,2298	—		—	—	—
30. „	825	0,1215	0,0251	1,6689	—		—	—	—
31. „	780	0,1035	0,1016	2,6764	—		—	—	—
	6620	0,9639	0,5974	16,5184	—		1,4198	0,7830	6,1515
XII. Periode. Täglich 3,00 Calciumlactat vom 1. VI. bis 14. VI.									
1. VI.	915	0,1181	0,0944	2,5033	—	6. VI.	2,2216	0,7119	5,6780
2. „	870	0,1608	0,1020	1,7426	—	8. „	1,1934	0,4136	3,1640
3. „	695	0,1237	0,0860	1,7681	—	11. „	1,2832	0,3628	3,4083
4. „	960	0,1308	0,0919	2,9861	—	14. „	1,7134	0,4551	3,7276
5. „	775	0,0967	0,0885	2,9292	—	15. „	0,9926	0,2921	2,0027
6. „	780	0,1396	0,1170	2,4343	—	17. „	0,5156	0,1641	1,3430
7. „	695	0,1228	0,1528	2,5425	—		—	—	—
8. „	730	0,1580	0,1123	2,8128	—		—	—	—
9. „	770	0,1408	0,0919	2,1162	—		—	—	—
10. „	995	0,1580	0,0960	2,2587	—		—	—	—
11. „	780	0,1229	0,0678	1,8429	—		—	—	—
12. „	1385	0,1381	0,1026	3,1849	—		—	—	—
13. „	890	0,1492	0,1005	2,2845	—		—	—	—
14. „	995	0,2014	0,1222	2,6960	—		—	—	—
	12235	1,9609	1,4259	34,1021	—		7,9198	2,3996	19,3236

Tabelle IV. Bilanz.

Perioden-nummer	Versuchszeit	Eingeführt in Form von	$Ca^{..}$	$Mg^{..}$	HPO_4''	Ausgeführt durch	$Ca^{..}$	$Mg^{..}$	HPO_4''	Gewichts-verlust
					Vorversuch.					
I.	15. III. bis 22. III.	Nahrung	1,8004	1,0040	24,1908	Kot	2,4427	1,0985	13,3223	
						Harn	1,3855	1,0255	17,0972	
						Zusammen	3,8282	2,1240	30,4195	— 1 kg
					1. Versuch.					
II.	23. III. bis 29. III.	Nahrung	1,5963	0,7547	19,5803	Kot	12,7176	1,1617	20,6653	
		$Ca_3(PO_4)_2$ . . .	15,4252	—	24,6190	Harn	1,1128	0,6393	19,0429	
		Zusammen	17,0215	0,7547	44,1993	Zusammen	13,8304	1,8010	39,7082	— 1½ kg
III.	30. III. bis 5. IV.	Nahrung	1,5797	0,8692	22,7481	Kot	4,6292	0,9351	13,9335	
						Harn	0,9153	0,6068	15,1362	
						Zusammen	5,5445	1,5419	29,0697	— 1 kg
		Gesamtsumme	18,6012	1,6239	66,9474	Gesamtsumme	19,3749	3,3429	68,7779	— 2½ kg
					2. Versuch.					
IV.	6. IV. bis 12. IV.	Nahrung	1,6221	0,8750	21,1410	Kot	17,7809	1,5360	34,3150	
		$CaHPO_4$	17,7940	—	42,9730	Harn	0,9899	0,5935	26,5352	
		Zusammen	19,4161	0,8750	64,1140	Zusammen	18,7708	2,1295	60,8502	— 1¼ kg
V.	13. IV. bis 19. IV.	Nahrung	1,8156	0,9515	22,1277	Kot	4,4411	1,2189	14,1513	
						Harn	0,8852	0,5658	17,4883	
						Zusammen	5,3263	1,7847	31,6396	— ½ kg
		Gesamtsumme	21,2317	1,8265	86,2417	Gesamtsumme	24,0971	3,9142	92,4898	— 1¾ kg
					3. Versuch.					
VI.	20. IV. bis 26. IV.	Nahrung	1,6753	0,8682	18,6929	Kot	13,5952	1,3732	11,4045	
		$Ca(H_2PO_2)_2$ . .	17,0450	—	79,3730	Harn	1,8878	0,8145	90,6105	
		Zusammen	18,7203	0,8682	98,0659	Zusammen	15,4830	2,1877	102,0150	± 0 kg
VII.	27. IV. bis 3. V.	Nahrung	1,6458	0,8526	21,3100	Kot	5,1937	1,2557	11,7765	
						Harn	1,2508	0,5823	15,1500	
						Zusammen	6,4445	1,8380	26,9265	— 1¼ kg
		Gesamtsumme	20,3661	1,7208	119,3759	Gesamtsumme	21,9275	4,0257	128,9415	— 1¼ kg

4. Versuch.

VIII.	4. V. bis 10. V.	Nahrung	1,6493	0,8543	22,6244	Kot	1,3052	0,9900	6,3024	
		Lecithin	—	—	4,4138	Harn	0,7120	0,5896	18,9276	
		Zusammen	1,6493	0,8543	27,0382	Zusammen	2,0172	1,5796	25,2300	$-\frac{1}{4}$ kg
IX.	11. V. bis 17. V.	Nahrung	1,5834	0,7857	19,9192	Kot	2,4245	1,3305	9,9373	
						Harn	0,7485	0,5612	15,8304	
						Zusammen	3,1730	1,8917	25,7677	$-\frac{1}{4}$ kg
		Gesamtsumme	3,2327	1,6400	46,9574	Gesamtsumme	5,1902	3,4713	50,9977	$-\frac{1}{2}$ kg

5. Versuch.

X.	18. V. bis 24. V.	Nahrung	1,6642	0,8660	20,3635					
		Lecithin	—	—	4,4138	Kot	4,7866	1,4442	12,5239	
		Calciumlactat . .	4,5024	—	—	Harn	0,8704	0,6014	18,8742	
		Zusammen	6,1666	0,8660	24,7773	Zusammen	5,6570	2,0456	31,3981	$\pm$ 0 kg
XI.	25. V. bis 31. V.	Nahrung	1,7315	0,9784	24,6300	Kot	1,4198	0,7830	6,1515	
						Harn	0,9639	0,5974	16,5184	
						Zusammen	2,3837	1,3804	22,6699	— 1 kg
		Gesamtsumme	7,8981	1,8444	49,4073	Gesamtsumme	8,0407	3,4260	54,0680	— 1 kg

6. Versuch.

XII.	1. VI. bis 14. VI.	Nahrung	3,4673	1,7667	42,5537	Kot	7,9198	2,3996	19,3236	
		Calciumlactat . .	9,0048	—	—	Harn	1,9609	1,4259	34,1021	
		Zusammen	12,4721	1,7667	42,5537	Zusammen	9,8807	3,8255	53,4257	$-\frac{1}{4}$ kg

Nachwirkung.

15. VI. bis 21. VI.	Bei normaler Ernährung	$-\frac{1}{4}$ kg
22. VI. bis 28. VI.	„ „ „	+ 0 kg
29. VI. bis 1. VIII.	„ „ „	$+2\frac{1}{4}$ kg

Erstens kann der Gewichtsverlust nicht durch eine vergrößerte Wasserausfuhr zustande gekommen sein; gerade die Perioden der stärksten Gewichtsabnahme zeigen (Tab. IV) eine ungewöhnlich geringe Harnmenge, und umgekehrt ist das Körpergewicht in den Perioden mit vergrößerter Harnabsonderung im allgemeinen fast konstant geblieben. Dabei zeigte der spärliche Stuhlgang der Diät entsprechend Obstipationscharakter, war also eher zu fest als zu lose. Zweitens zeigt eben die Tab. IV, daß sowohl von $Ca^{\cdot\cdot}$ als von $Mg^{\cdot\cdot}$ und HPO_4'' weit mehr aus- als eingeführt wurde. Drittens deutet schließlich auf eine unvollständige Oxydation im Organismus, daß ich, der ich sonst gar keine gichtische Veranlagung besitze, einen immer harnsäurereicheren Harn bekam, der gegen Ende der Versuche, in der X. und XI. Periode sogar schon beim Lassen durch Harnsäure und Ammoniumurat ganz dick und undurchsichtig getrübt war. Diese Trübung konnte in der XII. Periode, der reichlichen Calciumzufuhr entsprechend, nicht weiter erscheinen.

Endlich zeigt noch ein anderer Umstand, daß tatsächlich die Zusammensetzung und nicht die Menge der Nährstoffe für das Sinken des Körpergewichtes verantwortlich gewesen ist. Nach der Beendigung der Versuche habe ich eine ganz besonders gewählte, reichliche und kräftige Diät geführt, und trotzdem sank mein Körgergewicht während der ersten folgenden 8 Tage doppelt so schnell wie in den vorhergehenden 14 Tagen, um im Laufe der zweiten Woche stationär zu werden und dann erst ganz allmählich zu steigen. Das tatsächlich ein sozusagen auf Vergiftung beruhender, durch die Fleischdiät verursachter Marasmus und keine Unterernährung vorlag, geht endlich noch daraus hervor, daß ich trotz kräftiger und reichlicher Ernährung und vernünftiger Lebensweise jetzt, 5 Monate nachher, immer noch anämisch und neurasthenisch bin und immer noch $4^1/_2$ kg weniger als vor den Versuchen wiege.

Wenn auch dieser Gewichtsverlust an sich für die Versuche über die Ausscheidungsformen der Phosphorsäure bei Gegenwart von Calcium gleichgültig ist, zeigt er sich doch bei der Beurteilung der Resultate sehr störend. So einfach die Frage bei einem im Gleichgewicht befindlichen Organismus gewesen wäre, so sind hier die Resultate durch die durch den Gewebezerfall hervorgerufene Mehrausscheidung von Calcium und Phosphorsäure kompliziert worden, wie aus der Bilanz, Tab. IV, sofort hervorgeht. Zum Glück hatte ich jedoch die Dosierung der verschiedenen Präparate so hoch bemessen, daß die durch den Gewebezerfall bedingte Mehrausscheidung demgegenüber gewöhnlich völlig zurücktritt.

So wurden in der ersten Versuchsserie während der Versuchsperiode täglich 6,2 g Tricalciumphosphat gegeben, also zusammen 43,4 g $Ca_3P_2O_8$ oder gemäß besonderer Analyse rund 15,4 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und 24,6 g HPO_4''. Die Zufuhr durch die Nahrung betrug nur 1,6 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und 19,6 g HPO_4'' in der Versuchsperiode, 1,6 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und 22,7 g HPO_4'' in der Nachperiode, also zusammen 3,2 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und 42,3 g HPO_4''. Die Gesamtaus-

scheidung betrug 19,4 g $Ca^{\cdot\cdot}$ und 68,8 g HPO_4''. In der Vorperiode zeigte sich nun eine Mehrausscheidung gegenüber der Einfuhr von 2,0 g $Ca^{\cdot\cdot}$. Nehmen wir nun an, daß die Mehrausscheidung stets gleich geblieben ist, so bekommen wir:

$Ca^{\cdot\cdot}$-Ausscheidung in Versuch 1		19,4 g
Einfuhr mit der Nahrung . .	3,2 g	
Mehrausscheidung	3,6 g	6,8 g
eine Ausfuhr von $Ca^{\cdot\cdot}$ aus $Ca_3P_2O_8$ von		12,6 g;

also sollte von dem als $Ca_3P_2O_8$ eingeführten $Ca^{\cdot\cdot}$ 2,8 g vom Körper zurückgehalten worden sein, während trotzdem eine Mehrausfuhr von 3,6 g stattfand. Wahrscheinlicher ist wohl, daß alles eingeführte Ca wieder ausgeführt wurde und die Mehrausscheidung in diesem Versuch nur 0,8 g $Ca^{\cdot\cdot}$ betrug. Betrachten wir die Verhältnisse bei der Phosphorsäure, so erhalten wir eben ein ähnliches, wenig wahrscheinliches Resultat:

HPO_4''-Ausscheidung in Versuch 1		68,8 g
Einfuhr mit der Nahrung . . .	42,3 g	
Mehrausscheidung aus der Vorperiode berechnet	10,9 g	53,2 g
Ausfuhr von HPO_4'' aus $Ca_3P_2O_8$ stammend, nur		15,6 g;

also sollten von dem Tricalciumphosphate 9,0 g im Körper zum Ansatz gekommen sein, ein Resultat, das, wie wir ja wissen, einfach unmöglich ist. Also ist es nicht gestattet, die Mehrausscheidung in der Vorperiode ohne weiteres auf die Versuchsperiode zu übertragen. Und doch gibt uns die Vorperiode ein Mittel, womit wir die Verhältnisse klären können.

In der Vorperiode betrug das Verhältnis der Mehrausscheidung an $Ca^{\cdot\cdot}$ zu der an HPO_4'' 1:3,1. Nehmen wir an, daß die Mehrausscheidung auf Gewebezerfall beruhe, so wird dieses Verhältnis wohl auch bei sonst gleich bleibenden Bedingungen konstant sein. Zufuhr von $Ca_3P_2O_8$, einer gesättigten Verbindung, sollte nichts daran ändern können; berechnen wir also die Phosphorsäuremehrausscheidung nach diesem Verhältnis, so beträgt sie

$$0{,}8 : x = 1 : 3{,}1; \qquad x = 2{,}5.$$

2,5 g HPO_4''. Wir erhalten dann eine aus $Ca_3P_2O_8$ stammende

HPO_4''-Ausscheidung im Versuch 1		68,8 g
Einfuhr durch die Nahrung . . .	42,3 g	
Berechnete Mehrausscheidung . .	2,5 g	44,8 g
	aus $Ca_3P_2O_8$	24,0 g)

HPO_4''-Ausscheidung von 24,0 g, während die Einfuhr 24,6 g betrug. Da der Organismus ja kein Reagensglas ist, kann man schwerlich eine bessere Übereinstimmung erwarten. Daraus ergibt sich dann, daß das eingeführte Tricalciumphosphat als solches, und zwar vollständig wieder ausgeschieden worden ist.

Gegen diese Beweisführung könnte man anführen, daß durch die fortdauernde unverhältnismäßig viel größere Zufuhr von HPO_4'' als von $Ca^{\cdot\cdot}$ der Organismus rascher an $Ca^{\cdot\cdot}$ als an HPO_4'' verarmen würde, also das oben angenommene Verhältnis 1 Ca : 3,1 HPO_4'' sich immer mehr zugunsten der Phosphorsäure verschieben würde. Tatsächlich ist das Verhältnis auch in dem dritten Versuch auf 1 : 6,3 gestiegen; dafür war es aber in Versuch 2 nur 1 : 2,2. Berücksichtigt man, daß bei der Einfuhr gleicher $Ca^{\cdot\cdot}$-Mengen als Phosphat in Versuch 3 fast doppelt so viel Säure wie in Versuch 2 eingeführt wurde, so erscheint dies allerdings nicht verwunderlich. In den beiden Versuchen 2 und 3 zusammen aber erhalten wir wieder das Verhältnis 1 : 3,6.[1]) Mag also allmählich die Mehrausfuhr an Phosphorsäure durchschnittlich etwas größer als die an Calcium werden, so wird meine Beweisführung wohl doch immer noch für den ersten Versuch zutreffen.

Daß dabei das Tricalciumphosphat durch den Darm, also mit dem Kot ausgeschieden ist, lehrt ein Blick auf die Tabelle IV ohne weiteres. Ebenso zeigt die Kurventabelle (Fig. 1) überaus deutlich, daß die Ausscheidung in dem Kote während dieser Periode tatsächlich in Form von Tricalciumphosphat stattgefunden hat, ein weiterer Beweis für die Richtigkeit meiner obenstehenden Beweisführung.

Man könnte dies nun so erklären, daß das in Wasser sehr schwer, in alkalischen Medien gar nicht lösliche Tricalciumphosphat den Verdauungstractus ohne Resorption glatt hindurchpassiert hätte. In der Tat ist auch ein guter Teil bei den hier gebrauchten hohen Dosen ohne weiteres durchgegangen, wie die mikroskopische Untersuchung der Faeces lehrte, aber andererseits wäre es unfaßlich, daß das in stark verdünnter Salzsäure ziemlich leicht lösliche Präparat den Magen, der bei mir völlig normal funktioniert, passiert haben könnte, ohne daß ein großer Teil gelöst worden wäre. Diese Lösung in dem sauren Magensaft geschieht

[1]) In Versuch 2 sind zwar nur $^2/_3$ der Phosphorsäure in dem Präparat durch Ca abgesättigt, dafür ist in Versuch 3 tatsächlich so wenig Phosphorsäure (durch Oxydation entstanden) eingeführt worden, daß nur etwa $^1/_4$ des Calciums zu deren Absättigung nötig ist. Wurde also in der einen Periode zu viel, so wurde in der anderen ungefähr entsprechend zu wenig eingeführt, daß schließlich der Effekt von beiden Versuchen ungefähr der von der Darreichung von $Ca_3P_2O_8$ wurde.

Tabelle V.

Ausscheidung von $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$ und HPO_4'' durch den Darm.

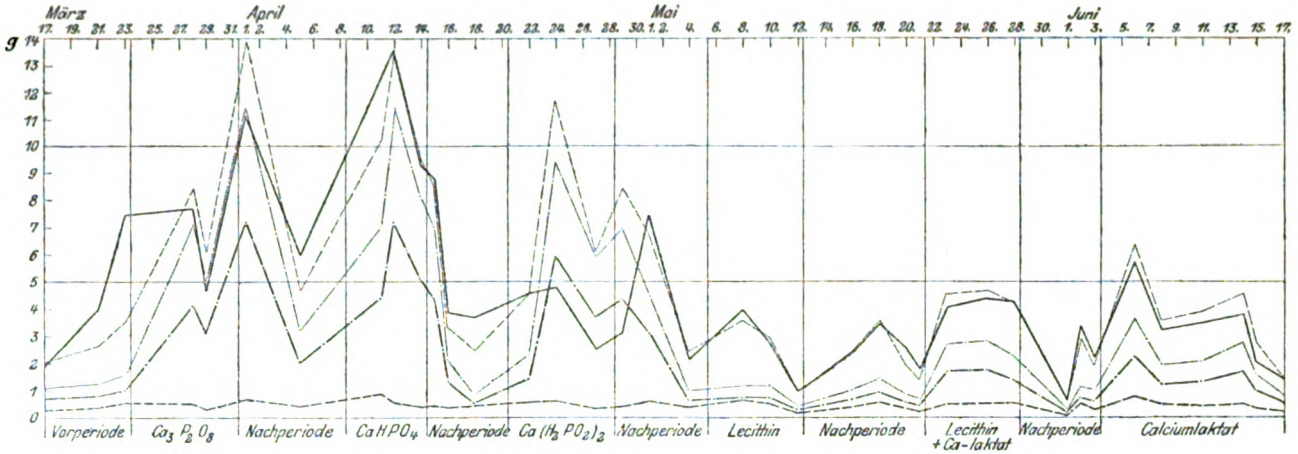


Fig. 1.

——— g HPO_4''
- - - - - - - g $Mg^{\cdot\cdot}$
-·-·-·- g $Ca^{\cdot\cdot}$
- - - - - - - g HPO_4'' aus $Ca^{\cdot\cdot}$ für $Ca_3P_2O_8$ und $Mg^{\cdot\cdot}$ für $MgNH_4PO_4$
———·——— g HPO_4'' aus $Ca^{\cdot\cdot}$ für $Ca_3P_2O_8$

wohl unter Zerlegung des Präparats in $CaHPO_4$ oder $Ca(H_2PO_4)_2$ und $CaCl_2$, die beide resorbiert werden können, um so mehr, da ja die saure Reaktion des Verdauungsgemenges noch ein gutes Stück in den Darm hinein vorherrscht. Die sauren Calciumphosphate sind dann unter Einfluß der alkalischen Körpersäfte bei der Ausscheidung durch den Darm wieder in $Ca_3(PO_4)_2$ verwandelt worden, wobei es gleichgültig bleibt, ob man sich vorstellen will, daß das aus dem eingeführten Phosphat entstandene $CaCl_2$ wieder sein Calcium zu diesem Zwecke hat hergeben müssen, oder dieses durch den Harn eliminiert und dafür Calcium, das sonst durch die Nieren ausgeschieden worden wäre, hierzu verbraucht worden ist. Der Effekt bleibt derselbe: durch die Zufuhr von $Ca_3(PO_4)_2$ findet keine Calciumbereicherung des Organismus statt, noch wird dadurch die Calciumausfuhr durch die Nieren vergrößert.

Beweis hierfür ist auch, daß das Harnvolumen bei diesem Versuche, wenigstens solange noch das Calciumphosphat im Organismus vorhanden war, unbeeinflußt geblieben ist (Tab. III u. IV).

Es dürfte nicht überflüssig sein, darauf hinzuweisen, daß wir uns diesen Vorgang der Ausscheidung nicht etwa so vorstellen dürfen, als ginge das Calciumphosphat nebst Chlorcalcium einfach durch die Zottenwände hindurch ins Blut über und würde dann von diesem nach dem Darm transportiert, wo es ausgeschieden und gleichzeitig mit Calcium gesättigt werden würde. Vielmehr dürfte die alkalische Reaktion des Blutes der direkten Calciumaufnahme einen unüberwindlichen Widerstand entgegensetzen. Überhaupt beruht die Blutüberfüllung der Organe des Unterleibes während der Verdauung nicht darauf, daß, wie überaus häufig angenommen wird, das Blut das Verdaute aufnimmt. Sie ist vielmehr als eine Folge der erhöhten Tätigkeit der Muskulatur und vor allem der sezernierenden Drüsen aufzufassen. Die Aufsaugung des Verdauungsgemisches wird normalerweise wohl ausschließlich von den Lymphgefäßen besorgt, die das Gemisch zur weiteren Verarbeitung zu den Lymphdrüsen transportieren. Wahrscheinlich wird hierbei das Calciumphosphat sofort beim Übergang in die Lymphbahn in Alkaliphosphat und eine lösliche, organische Calciumverbindung, die nicht ionisierbar sein dürfte, überführt, und ein ähnliches Schicksal wird wohl überhaupt alle anorganischen Calciumverbindungen bei der Resorption ereilen, die in den Verdauungstractus eingeführt werden. Erst nach der Passage der Lymphdrüsen, die wir uns wohl als Transformatoren vorstellen können, und nach Erfüllung ihrer ernährenden Tätigkeit wird dann die Lymphe mitsamt Phosphorsäure und anderen unausnutzbaren Stoffen ins Blut übergehen. Aus dem Blute scheiden dann die Nieren normaliter nur so viel Phosphate (als Alkaliverbindungen) aus, wie zur Erhaltung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Harnes nötig sein wird, während der Darm bei genügendem Kalkgehalt des Blutes die übrigbleibenden, überschüssigen Alkaliphosphate unter gleichzeitiger Umwandlung derselben in Tricalciumphosphat oder in anormalen Fällen, wie wir

gleich sehen werden, auch in Ammoniummagnesiumphosphat nach dem Darmlumen abscheidet. Nur so, durch den Umweg über die Lymphdrüsen usw. und durch die Umwandlung in lösliche, aber nicht ionisierbare Verbindungen läßt sich erstens überhaupt das Vorkommen von Calcium im Blut neben Alkaliphosphat bei alkalischer Reaktion und zweitens die Verzögerung der Ausfuhr der per os gegebenen Verbindungen um mehrere Tage erklären, während die Ausfuhr der direkt in die Blutbahn eingeführten Calciumverbindungen ja sofort erfolgt. Diese Überlegung ist außerordentlich wichtig, wie ja überhaupt die Frage nach dem Resorptionswege und dem Resorptionsmechanismus und die sich daraus ergebenden Konsequenzen von ungeheurer Bedeutung für die ganze Ernährungslehre sein müssen. Leider sind unsere Kenntnisse in dieser Hinsicht, offen gestanden, ziemlich gleich Null. In dem Bedauern dieser Tatsache soll kein Vorwurf enthalten sein; ich bin mir wohl bewußt, daß Untersuchungen auf diesem Gebiete auf die gewaltigsten Schwierigkeiten stoßen müssen, vor allem technische Schwierigkeiten, im Vergleich mit denen die kompliziertesten unserer jetzigen Methoden zur Untersuchung der Stoffwechselvorgänge das reinste Kinderspielzeug sein dürften.

Gehen wir jetzt zum zweiten Versuch über. In diesem wurden während der eigentlichen Versuchsperiode täglich 10,3 g $CaHPO_4$, 2 aq. gegeben. Dieses Präparat ist nun so viel löslicher als das vorhergehende, daß wir eine vollkommene Resorption erwarten können, und in der Tat wurden auch bei der mikroskopischen Durchsuchung der Faeces keine vom Dicalciumphosphat herrührenden Krystalltrümmer vorgefunden. Bei der Aufnahme in den Organismus wird dieses Präparat denselben Umwandlungen wie das erste unterworfen sein. Der Ausscheidungsmechanismus wird jedoch etwas anders dadurch werden, daß in diesem Präparate die Phosphorsäure nur zu zwei Dritteln durch Kalk abgesättigt ist. Verfügt der Organismus über einen hinreichenden Reservevorrat von Kalk, und gibt man, wie Röse, nur kleine Dosen von dem Präparate, so wird wohl auch das letzte Drittel der Phosphorsäure auf Kosten des Organismus an Calcium gebunden, und die ganze eingeführte Phosphorsäuremenge in Form von Tricalciumphosphat durch den Darm entfernt. Anders liegen die Verhältnisse, wenn der Organismus wie in Röses zweiten Versuch nur geringe oder gar keine Reservelager von Kalk zur Verfügung hat, oder wenn man wie in meinen Versuchen, mit etwas größeren Gaben arbeitet. In diesem Falle werden erstlich $^2/_3$ der Phosphorsäure, durch

das gleichzeitig eingeführte Calcium abgesättigt, als Tricalciumphosphat durch den Darm ausgeführt. Weiter aber reduziert der Organismus unter Vergrößerung der Harnacidität die normale Kalkmenge des Harns, um mit diesem Calcium noch eine Quantität Phosphorsäure als tertiäres Calciumsalz durch den Darm auszuscheiden. Ist hierbei die Harnacidität an die Grenze des zulässigen gestiegen und sind doch noch überschüssige Phosphate im Blut vorhanden, so wird dieser Überschuß ebenfalls durch den Darm, aber jetzt in Form von Ammoniummagnesiumphosphat, ausgeschieden. Ein Blick auf die Tabellen III und IV, besonders auch auf die Kurventabelle bestätigt aufs augenfälligste diese meine aprioristische Überlegung. Durch diese wird dann aber auch erklärt, weshalb in dieser Versuchsreihe das Verhältnis des Calciums zur Phosphorsäure in der „Mehrausscheidung" von 1:3,1 zugunsten des Ca zu 1:2,2 verschoben worden ist; also wieder eine Bestätigung meiner Beweisführung in dem ersten Versuch.

Wie stimmt nun dies mit dem Verhalten der Nieren überein? Im ersten Falle, beim kalkreichen Organismus (der jedoch nie für diese Medikation in Betracht kommen kann), wird ein kleiner Kalkraub nicht viel ausmachen, immerhin könnte man eine kleine Verminderung der Nierentätigkeit, also auch der Harnmenge erwarten. Im zweiten Falle wird ein noch so kleiner Kalkraub, der da hauptsächlich auf Kosten des Harncalciums geschieht, entschieden mehr zu besagen haben, also eine entschiedene Verringerung der Harnmenge herbeiführen. In beiden Fällen stimmt nun die Überlegung vollkommen mit dem experimentellen Befund überein.

Da sowohl durch Röses als durch meine eigenen, vorstehenden Versuche die vollkommene Richtigkeit der logischen Überlegung bestätigt worden war, erübrigte es sich, auch das Verhalten des Monocalciumphosphates zu untersuchen: konnte man doch von diesem nur alle schädlichen Wirkungen der Calciumphosphate in höchster Potenz erwarten. Damit wären nun eigentlich die durch Röses Arbeit veranlaßten Versuche zu Ende; da ich aber so schön im Zuge war, habe ich auch das Verhalten einiger anderer

offizinellen Präparate einer Untersuchung unterworfen. Zuerst ging ich zum Studium des Calciumhypophosphites $Ca(H_2PO_2)_2$ über, von dem ich während des dritten Versuches täglich 10,2 g einnahm.

Erst als ich meine Versuche längst beendet hatte, fiel mir das Referat einer Arbeit von A. Patta[1]) in die Hände. Patta hat die Resorption des Natriumhypophosphites untersucht und faßt seine Resultate dahin zusammen, daß nie die totale Quantität des unveränderten Salzes ausgeschieden wird. Nach großen Gaben (er hat die Lösung eingespritzt) wird etwa die Hälfte in unveränderter Form ausgeschieden; je kleiner die Gaben werden, desto mehr unterliegt das Salz im Organismus der Oxydation, so daß bei kleinen Dosen (0,6 g) nur noch $^1/_6$ unverändert im Harn erscheint. Daraus schließt der Verfasser wunderbarerweise, daß das Präparat vom Organismus zum Teil zurückgehalten werden kann. Aus dem Referat will es scheinen, als ob Patta nur den Harn, nicht aber die Faeces untersucht hat, und nur so kann man seine Schlußfolgerung erklären, wenn diese Erklärung nicht etwa darin zu suchen ist, daß der Verfasser die Ausscheidung in der Nachperiode nicht berücksichtigt hat. Ich bin jedenfalls zu einem anderen Resultat gekommen.

In den Nachperioden wurde bei meinen Versuchen durch die Nieren durchschnittlich 16,3 g HPO_4'' ausgeführt, größte Differenzen: $+0{,}5$ und $-1{,}6$. Wenn wir außerdem berücksichtigen, daß die Ausfuhr der Phosphorsäure durch den Harn stets innerhalb 24 Stunden beendet ist, so werden wir keinen wesentlichen Fehler begehen, wenn wir diese Zahl als die vom Organismus bei dieser Diät ohne besondere Phosphorsäurezufuhr durch die Nieren ausgeschiedene HPO_4''-Menge annehmen, ganz besonders da die HPO_4''-Mehrausscheidung, wie aus den Tabellen und den obenstehenden Ausführungen hervorgeht, vor allem auf die Ausscheidung durch den Darm fällt, und bei der Harnphosphorsäure keine oder doch nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Da, wie gesagt, die Phosphorsäureausfuhr durch die Nieren innerhalb 24 Stunden beendet ist, so erhalten wir den Anteil der präformierten Phosphorsäure, die durch Oxydation von Hypophosphit entstanden und durch die Nieren ausgeführt worden ist, wenn wir von der präformierten Phosphorsäure der Versuchswoche die Durchschnittszahl abziehen; $19{,}4 - 16{,}7 = 2{,}7$ g. Da jedoch die Ausscheidung

[1]) A. Patta, Archiv. Farmacol. 9, 1, 1910; Biochem. Centralbl. 10, 620, 1910.

der präformierten Phosphorsäure durch die Nieren in der Nachperiode gerade die größte negative Abweichung vom angenommenen Durchschnitt aufweist, so wäre es ja möglich, daß dieser oxydierte, durch die Nieren ausgeschiedene Anteil noch etwas größer, etwa 3,7 bis 4 g sein könnte. Ebenso wahrscheinlich wäre aber auch, daß die HPO_4''-Ausscheidung in der Nachperiode deshalb so niedrig wäre, weil in der Versuchsperiode zu viel Phosphorsäure durch die Nieren ausgeschieden worden ist; dann könnte man den Anteil der präformierten Phosphorsäure an oxydierter unterphosphoriger Säure nur auf etwa 1,1 g schätzen. Da beide Annahmen gleiche Wahrscheinlichkeit besitzen, fahren wir wohl auf der Mittelstraße am sichersten, indem wir eben annehmen, daß die 2,7 g HPO_4'' in dem Harn der Versuchsperiode durch Oxydation der eingeführten unterphosphorigen Säure entstanden sind.[1]) Die Menge der unverändert durch die Nieren ausgeschiedenen unterphosphorigen Säure beträgt, wie aus Tabelle III hervorgeht, 72,6 g, also ist, trotzdem in meinen Versuchen durch die Verabreichung des Präparates per os die Gelegenheit zur Oxydation außerordentlich viel größer als in Pattas Versuchen war, nur $79{,}4 - 72{,}9 = 6{,}5$ g, also etwa $^1/_{12}$ bis $^1/_{18}$ der unterphosphorigen Säure oxydiert worden, während Patta bei großen Dosen noch immer $^1/_2$ fand.

Nehmen wir an, daß die 2,7 g HPO_4'' im Harn tatsächlich oxydierte unterphosphorige Säure darstellen, so erhalten wir den Anteil der durch den Darm ausgeschiedenen oxydierten unterphosphorigen Säure zu $79{,}4 - (72{,}9 + 2{,}7) = 3{,}8$ g HPO_4''. (Dasselbe Resultat bekommt man natürlich, wenn man von der Gesamtausfuhr von HPO_4'' die Nahrungsphosphorsäure, Harnphosphorsäure, Hypophosphitphosphorsäure und Phosphorsäuremehrausscheidung abzieht: $128{,}9 - [40{,}0 + 72{,}9 + 2{,}7 + 9{,}5] = 3{,}8$.)

Die Form, in der die Phosphorsäure durch den Darm ausgeschieden wurde, ergibt sich aus den Kurventabellen. Im Anfang des Versuches (Defäkationen vom 22. IV b bis 29. IV b, Tabelle III) überwiegt die Calciumausscheidung die

[1]) Das genaue Studium der Tabellen III und IV wird auch sonst diese Annahme als die am meisten wahrscheinliche erscheinen lassen.

der Phosphorsäure bei weitem, hier muß also die Phosphorsäure sicher als Tricalciumphosphat ausgeschieden worden sein.[1]) Gegen Ende sinkt jedoch die Calciumausfuhr rapid, und man muß wohl annehmen, daß während dieser Zeit ein Teil der Darmphosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat eliminiert wurde, was ja auch das fast absolute Zusammenfallen der hierfür berechneten mit der tatsächlich gefundenen Kurve vollkommen bestätigt.

Zwar ist auch in diesem Versuch mehr Calcium ausgeführt als eingeführt worden, und doch müssen wir wohl annnehmen, daß das als Calciumhypophosphit eingeführte Calcium, abgesehen von der geringen Menge, die zur Neutralisation der durch den Darm ausgeschiedenen unterphosphorigen Säure nötig ist, also zu etwa $^4/_5$ bis $^2/_3$ dem Organismus zur freien Verfügung gestanden hat. Damit steht im Einklang, daß trotz stark gesteigerter Mehrausfuhr an HPO_4'' die Mehrausfuhr an Ca nur 1,5 g statt sonst 2,5 g beträgt, so daß das Verhältnis Ca zu HPO_4'' in der Mehrausfuhr statt 1:3 hier 1:6,3 beträgt. Hiermit steht auch im Einklang die starke diuretische Wirkung des Präparates, die auf eine Vergrößerung des Calciumgehaltes im Harn zurückzuführen ist.

Gegen letztere Überlegung könnte man einwenden, daß die Steigerung der Harnmenge auf eine Nierenreizung durch das stark saure Exkret zurückzuführen sei. Tatsächlich trat auch eine ganz leichte Nierenreizung (spärliche Leukocyten, ganz vereinzelte hyaline Zylinder im Harn) am letzten Versuchstage auf, die jedoch schon am zweiten Tage nach dem Aussetzen des Mittels völlig wieder verschwand. Gegen diese Annahme und für die obige Beweisführung spricht jedoch, daß die Harnmenge gerade an diesen Tagen eher eine Verminderung als eine Vermehrung aufweist.

Endlich: der als Hypophosphit eingeführte Phosphor ist vollständig wieder ausgeschieden worden; statt einer Phosphorretention hat die Darreichung des Calciumhypophosphites eine Steigerung der Phosphorsäuremehrausfuhr, also des Gewebezerfalles um rund 50% veranlaßt!

---

[1]) In welcher Form die restierenden 7,0 g Ca durch den Darm ausgeschieden worden sind, kann ich nicht sagen, wahrscheinlich wohl als Sulfat. Da die HPO_4''-Mehrausscheidung in diesem Versuch so ganz bedeutend gesteigert ist, muß man wohl eine unter dem Einfluß einer starken Acidosis entstandene Zersetzung der Gewebe annehmen, wobei so viel SO_4'' entstand, daß sie nicht durch die Nieren allein bewältigt werden konnte.

Subjektiv wirkte das Präparat stark appetitanregend, besitzt aber einen äußerst widerlichen Geschmack und verursacht leicht ein nach Phosphorwasserstoff abscheulich riechendes und schmeckendes Aufstoßen.

Außer bei Krankheiten, die mit Kalkmangel einhergehen, gibt man jetzt Phosphorsäurepräparate auch bei Nervenerkrankungen, von der aus der Luft gegriffenen Behauptung ausgehend, daß Neurasthenie usw. auf Lecithinmangel in der Nervensubstanz beruhe, wobei man sich mit Vorliebe der „organischen" Präparate Lecithin und Phytin bedient. Abgesehen davon, daß ein solcher Lecithinmangel bis jetzt niemals einwandfrei nachgewiesen worden ist, muß man doch feststellen, daß wenn ein solcher tatsächlich vorhanden wäre, er doch nur ein Symptom, keine Ursache der Neurasthenie sein kann, ebenso wie der Kalkmangel der Knochen bei Rachitis oder die arteriellen Kalkeinlagerungen bei Arteriosklerose nur die Folgen, nicht die Ursachen der Krankheiten darstellen. Wenn den Nerven die Fähigkeit der Lecithinadsorption abgehen sollte, so ist nicht einzusehen, wie diese Fähigkeit durch vergrößerte Lecithinzufuhr gehoben werden könnte. Dazu kommt, daß P. Mayer und Goldscheider, Bokay, Hasebroek, Bergell und viele andere nachgewiesen haben, daß der Ester Lecithin wie alle anderen Ester bei der Verdauung, und zwar in Cholin, Fettsäuren und Glycerinphosphorsäure zerlegt wird.

Ich gehe noch weiter: eher möchte ich glauben, daß etwas von dem Diacylin der Spaltung entgehen könnte als die Glycerinphosphorsäure, denn es wäre doch völlig unverständlich, wenn eine so leicht spaltbare Estersäure wie Glycerinphosphorsäure der zerlegenden Einwirkung von den Esterasen der Verdauungssäfte und der Darm- und Magenschleimhäute widerstehen sollte. Ich habe deshalb mit Lecithin Versuche gemacht, wobei sich dann auch eine völlige Spaltung des Lecithins auch bei den größten Gaben ergab (Dosis maxim. bei meinen Versuchen war 5,35 g, bei einer anderen Versuchsperson einmal 10 g pro die). Obgleich ich nach meinem vorangegangenen Versuche ein ideales Beispiel von Neurasthenie darbot, also sicherlich nach der oben erwähnten Theorie ein sehr gutes Versuchsobjekt sein mußte, erschien bei mir wie bei anderen Versuchspersonen das Cholin binnen 19 Stunden quantitativ im Harn wieder.

Auch die Phosphorsäure erschien vollständig in den Ausleerungen wieder, und zwar bei mir zu gleichen Teilen im Harn und im Kot. Nehmen wir wieder als mittlere Phosphorsäureausscheidung einer Woche durch die Nieren zu 16,3 g an, so erhalten wir im Harn einen Überschuß von $34{,}8 - 32{,}6 = 2{,}2$ g HPO_4'', die wir auf Rechnung des Lecithins schreiben müssen. Da ja die Phosphorsäureausscheidung durch die Nieren, wie schon öfters betont, innerhalb 24 bis 36 Stunden beendigt ist, müßte dieses Plus in die eigentliche Versuchsperiode fallen, und ein Blick auf die Tabelle IV zeigt sofort, daß das auch der Fall war. Hierbei müssen wir annehmen, daß die Harnphosphorsäure, der stark sauren Reaktion des Harnes entsprechend, überwiegend als H_2PO_4'' vorhanden war.

Die noch vom Lecithin herstammenden 2,2 g HPO_4'' sind durch die Dickdarmschleimhäute und zwar wohl erst in der Nachperiode eliminiert worden. Im Kot findet sich die Phosphorsäure jetzt größtenteils als Ammoniummagnesiumphosphat, wie immer, wenn nicht genügend Kalk vorhanden war, um eine baldige Ausscheidung als Tricalciumphosphat zu ermöglichen. Daß das hier nicht der Fall war, ist ganz natürlich, denn in dieser Periode ist die Phosphorsäurezufuhr verhältnismäßig größer als in irgend einer vorhergehenden ($Ca'' : HPO_4''$ in der Einfuhr wie 1:15, sonst höchstens wie 1:6,0)!

Wurde doch in diesem Versuch kein Calcium mit dem Phosphorpräparat eingeführt; der Organismus, der schon an sich äußerst kalkarm war, war ausschließlich auf die Zufuhr von Calcium durch die Nahrung angewiesen, und dieses Calcium wurde, wie ja aus Tabelle IV und der Kurventabelle hervorgeht, durch die Nahrungsphosphorsäure schon überreichlich beansprucht. Trotz anfänglicher Versuche des Organismus, den Calciumgehalt im Kot zu steigern, konnte bei weitem nicht genügend herbeigeschafft werden, weshalb der Körper zum letzten Schutz gegen die unmittelbar drohende Acidosis griff, indem er seine Ammoniakproduktion erhöhte. Daß der Organismus hinsichtlich Calciums tatsächlich sein letztes hergegeben hat, geht aus dem Verhältnis Ca'' zu HPO_4 in der Mehrausscheidung hervor, das in diesem Versuch von 1:3,1 auf 1:2 gestiegen ist, im krassesten Widerspruch zu dem Verhältnis in der Einfuhr.

Durch die großen Cholinmengen, vielleicht aber noch mehr durch die durch H_2PO_4'' veranlaßte stark saure Reaktion des Harnes entstand

schon am dritten Versuchstage, eingeleitet von einem leichten kolikartigen Nierenschmerz eine schwere Nierenreizung mit stark vermehrtem Harndrang und undurchsichtig getrübtem Harn von charakteristischem Eitergeruch. Die Reizung ging erst am vierten Tage nach dem Aussetzen des Mittels zurück.

Da in diesem Versuch durch den extremen Kalkmangel des Organismus bei den angewandten großen Lecithingaben die Verhältnisse doch offenbar allzu pathologisch geworden waren, habe ich noch eine Versuchsreihe angeschlossen, in der neben Lecithin täglich eine zur Absättigung der Lecithinphosphorsäure mehr als genügende Menge Calciumlaktat (3,0 g) gegeben wurde. Der Erfolg war augenfällig; obgleich die Nieren doch jetzt offenbar zur Entzündung prädisponiert sein müßten, trat in diesem Versuch erst am letzten Versuchstage eine ganz leichte Reizung auf, die schon am zweiten Tage nach dem Aussetzen des Mittels vollkommen zurückging. Weiter stieg in der Versuchszeit sowohl Harn- als Kotcalcium beträchtlich an, so daß in diesem Versuch weit über die Hälfte der Kotphosphorsäure durch Calcium abgesättigt war. Immerhin scheint der Organismus schon so kalkarm geworden zu sein, daß wahrscheinlich ein Teil des eingeführten Calciums zur Deckung der schlimmsten Schäden verbraucht worden ist, da in der Mehrausscheidung nur ein winziges Plus von 0,1 g $Ca^{\cdot\cdot}$ 4,7 g HPO_4'' gegenübersteht, während ja sonst das Verhältnis etwa 1:3 war. Daß die Calciumgabe überaus gut getan hat, geht auch weiter daraus hervor, daß die Harnacidität sehr stark abnahm, während der sehr spärlichen Eiterentleerung sogar in amphotere Reaktion umschlug. Endlich war die Calciumzufuhr groß genug, um die Verteilung der Phosphorsäure in den Ausscheidungen zu verändern. Während in dem vierten Versuch in der Versuchswoche nur die durch den Harn eliminierbare Lecithinphosphorsäure ausgeschieden wurde und der Rest erst im Kote der Nachperiode erschien, ist in diesem Versuch alle Lecithinphosphorsäure und zwar durch den Darm noch während der Versuchswoche entfernt worden, so daß sich in der Nachperiode die Phosphorsäuremehrausfuhr sogar in das Gegenteil verwandelte.

Während der Lecithinversuche wurde ganz besonders darauf geachtet, ob eine Ausscheidung von Glycerinphosphorsäure durch die Nieren stattfand; dies war nicht der

Fall![1]) Nur dreimal wurden im Maximum 15 mg Phosphorsäure pro die in veresterter Form nachgewiesen, eine Menge, die physiologisch sein kann, aber noch sicherer durch unvermeidliche Versuchsfehler verursacht wurde. Ob ich nun Lecithin allein oder zusammen mit Calciumlaktat nahm, stets ist die Glycerinphosphorsäure total zerlegt worden. Der Organismus des Lungenkranken dagegen, der sich gegen Acidosis notgedrungen und höchst energisch schützen und mit seinem Kalkvorrat sehr sparsam umgehen muß, scheint unter Umständen etwas über ein Drittel, also ungefähr entsprechend der Menge Lecithinphosphorsäure, die in meinem Versuch ohne Calciumlaktat immer noch durch den Darm ausgeschieden ist, als Glycerinphosphorsäure durch die Nieren entfernen zu können. Daß dies jedoch die Folge einer im Organismus stattgefundenen Synthese und nicht etwa auf eine mangelhafte Spaltung der als Lecithin eingeführten Glycerinphosphorsäure seitens der Verdauungsorgane zurückzuführen ist, lehrte ein neuer Versuch bei derselben Person, wo bei gleicher Diät und gleicher Lecithingabe gleichzeitig Calciumlaktat verabreicht wurde: nun war die im Harn erscheinende Phosphorsäuremenge bedeutend verringert, und die Esterphosphorsäure verschwand bis auf physiologische Spuren (3,4 mg im Tagesharn). Übrigens blieb dieser Glycerinphosphorsäurebefund ganz alleinstehend; bei keinen weiteren Versuchen mit Lungenkranken habe ich eine Ausscheidung von Glycerinphosphorsäure beobachten können.

Zu den Lecithinversuchen muß noch etwas über meine subjektiven Wahrnehmungen gesagt werden. Während der Lecithindarreichung hob sich der Appetit stark, wie stets nach Darreichung von Mitteln, die freie Phosphorsäure enthalten oder leicht abspalten. Noch weit auffälliger war jedoch die durch das Mittel hervorgerufene Libido sexualis, die sogar zu nächtlichen Pollutionen führte. Weiter: anfangs verursachte der widerliche, an angebrannte Spiegeleier erinnernde Geruch des Lecithins (Ovo-Lecithin. puriss. 97%) etwas Widerwillen beim Einnehmen, bald jedoch verschwand dies Gefühl und machte einem anderen Raum: ich sehnte mich nach dem Mittel, hatte förmlich Hunger danach. Vor der Einnahme war ich reizbar, spürte Gliederzittern und Arbeitsunlust; diese Erscheinungen verschwanden etwa $^1/_2$ bis 1 Stunde nach der Einnahme von Lecithin, um einer ausgesprochenen Euphorie Platz zu geben.

---

[1]) Der Kot enthielt nur physiologische Lecithinspuren, deren Phosphorsäure kaum noch erkennbar war.

Noch mehr: nach dem Aussetzen des Mittels traten ganz deutliche Abstinenzerscheinungen hervor: allgemeine Schwäche und Reizbarkeit, Gliederzittern, Ohnmachtsanwandlungen, Arbeitsunlust bis -unfähigkeit, und vor allem eine förmliche Gier nach Lecithin. Die Wirkung des Lecithins ist also nicht die eines Stärkungsmittels, sondern vielmehr die eines gewaltigen Excitans, vollauf vergleichbar mit der von Nikotin, Coffein, Cocain usw. Dann aber ist, abgesehen von den vollständig falschen Voraussetzungen für die Darreichung, das Verordnen von Lecithin, besonders in größeren Gaben an Neurastheniker direkt als ein schwerer Kunstfehler zu bezeichnen. Kein Wunder, wenn die Leute lecithinhaltige Präparate „immer gern nehmen" oder „immer wieder benutzen"!

Eigentlich hatte ich auch das Calciumglycerophosphat oder Lactophosphat prüfen wollen; seit Jahren habe ich die Anschauung verfochten, daß diese in freiem Zustande schon durch Wasser zerlegbaren Ester absolut nutzlos für die Therapie wären, wenn man sie nicht als Aperitiva ansehen wollte. Nach den mit dem Lecithin gemachten Erfahrungen meinte ich jedoch, daß eine Untersuchung dieser Präparate eine nutzlose Zeitverschwendung sein würde.

Seit einiger Zeit wird ein neues, organisches Phosphorpräparat der Pflanzensamen, das Phytin, empfohlen. Dies sollte angeblich aus zwei durch eine Methylengruppe verbundene Phosphorsäureestern bestehen. Da hier doch ebenfalls ein (Methylenglykol-) Ester vorliegt, der nach der unvermeidlichen Spaltung im Laufe der Verdauung anorganische Phosphorsäure abgibt, wollte ich ursprünglich die Ausscheidungsverhältnisse auch beim Phytin untersuchen, bin jedoch nach Durchsicht der betreffenden Literatur davon abgekommen: es würde nicht der Mühe lohnen. C. Neuberg und B. Brahn[1]) sowie C. Neuberg[2]) haben übrigens nachgewiesen, daß Phytin ein Inosithexaphosphorsäureester ist, und E. Winterstein[3]) ist dann zu demselben Resultate gekommen. Diese Auffassung hat schließlich Contardi[4]) durch synthetische Versuche gestützt. Wie alle Ester der Polyphenole wird auch dieser auf Grund seiner Schwerlöslichkeit nur sehr schwer von Alkalien gespalten, was jedoch die Spaltungsfähigkeit gegenüber den esterspaltenden Enzymen der Verdauung nicht beeinträchtigt. Tatsächlich hat auch die Arbeit von Oskar Horner[5]) gezeigt, daß das Phytin im Orga-

---

[1]) Neuberg und Brahn, diese Zeitschr. 5, 443, 1907.

[2]) Neuberg, diese Zeitschr. 9. 557, 1908; 16, 406, 1909.

[3]) Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 118, 1908.

[4]) Contardi, Atti Real. Accad. dei Lincei Roma, 19, [5], 1910, I, 23,

[5]) O. Horner, diese Zeitschr. 2, 428, 1907.

nismus völlig zerlegt wird, wobei die Phosphorsäure teils durch den Darm (wohl als Tricalciumphosphat! Berg), teils durch die Nieren, und zwar vollkommen, wieder ausgeführt wird. (Horner macht übrigens ebenfalls darauf aufmerksam, daß die Phosphorsäureausscheidung nicht so prompt geschieht, wie manche Autoren augenscheinlich angenommen haben, sondern sich noch über einen Teil der Nachperiode erstrecke, wie sich ja aus allen vorstehenden Versuchen ergibt, und wie es ja bei Berücksichtigung des beim $Ca_3P_2O_8$-Versuche Gesagten nur als ganz natürlich erscheinen kann.) Zu denselben Resultaten kommt auch Rogozinski[1]), der beim Menschen die völlige Spaltung von Lecithin und Phytin durch die Verdauung wieder bestätigt.

Zum Schluß habe ich noch 14 Tage lang die Diät unter Zugabe von täglich 3,0 g Calciumlaktat fortgesetzt, um die Einwirkung dieses Mittels kennen zu lernen. Diese Wirkung ist augenfällig: selbst wenn man berücksichtigt, daß die letzten Calciumgaben (etwa 1,4 g Ca) wohl erst in den nachfolgenden drei Tagen hätten ausgeschieden werden können und daß der Gewebezerfall gemäß der Phosphorsäuremehrausscheidung und der fortgesetzten Gewichtsabnahme immer weiter ging, so hat doch ein starker Ansatz von Calcium im Organismus stattgefunden.

Im Anschluß an Röses und meine früheren Arbeiten, zu denen die vorstehenden Versuche einen gewissen Abschluß bilden, möchte ich die gewonnenen Resultate wie folgt zusammenfassen:

Die Calciumphosphate sind sowohl als Phosphate als auch als Calciumpräparate für die Therapie nutzlos oder direkt schädlich. Das Tricalciumsalz wird durch den Darm vollständig wieder als tertiäres Phosphat ausgeschieden, kann also weder die Diurese beeinflussen noch dem Organismus als Baustein, also z. B. als Heilmittel bei Rachitis dienen. Von den sauren Phosphaten wird eine dem eingeführten Calcium entsprechende Menge, teils auf Kosten des Körpercalciums eine weitere Menge als Tricalciumsalz durch den Darm ausgeführt; ein event. Rest der Phosphorsäure kann bei drohender Acidosis als Ammoniummagnesiumphosphat ebenfalls durch den Darm entfernt werden, wird aber normalerweise durch die Nieren ausgeschieden und vergrößert dabei die Harnacidität. Sowohl

[1]) Rogozinski, Anz. Akad. Wiss. Krakau 1910, B, 260.

durch die Verminderung des Kalkgehaltes als durch die Vermehrung der H_2PO_4''-Ionen im Exkret, wird die Tätigkeit der Nieren beeinträchtigt und es tritt eine größere oder geringere Verminderung der Harnmenge ein. Statt dem Organismus Kalk zuzuführen, beraubt man ihn also durch Gaben von sekundärem oder primärem Calciumphosphat seines Reservekalkes. Bei Krankheiten, die auf Kalkmangel beruhen, wie Rachitis, oder damit einhergehen, wie Gicht, sind diese Phosphate weit davon entfernt, Heilmittel zu sein, sondern vielmehr Gifte für den kranken Organismus. Die Calciumphosphate besitzen, wie alle anorganische Phosphorsäure abspaltenden Substanzen, eine schwach anregende Wirkung auf die Sekretion der Magenschleimhaut, sind jedoch bei weitem keine so ausgesprochen appetitanregenden Mittel, wie einige Tropfen verdünnter Phosphorsäure, ein seit langer Zeit bekanntes Mittel.

Calciumhypophosphit kann als Calciumpräparat sowie zur Hebung des Appetits gegeben werden, ist aber als Phosphorpräparat völlig unbrauchbar. Bei Lungenkranken und bei Leuten mit gichtischer Veranlagung ist die Verabreichung des Calciumhypophosphites wegen der drohenden Acidosis direkt kontraindiziert.

Will man eine verbesserte Peristaltik oder eine vermehrte Diurese herbeiführen, so kann man mit Erfolg zum Calciumsulfat oder Calciumchlorid greifen; diese beiden Mittel können auch mit Vorteil als Kalkpräparate bei Kalkmangel benutzt werden, wobei jedoch zu berücksichtigen bleibt, daß die eingeführten anorganischen Anionen zur Ausfuhr durch die Nieren dem Organismus Alkaliionen entreißen. Wo dies nicht erwünscht oder sogar nicht zulässig ist, wähle man als Kalkpräparat ein Salz einer organischen Säure, am besten das ziemlich leicht lösliche, im Organismus leicht und vollständig verbrennbare Calciumlactat, oder noch besser ein alkaliarmes, an Calciumbicarbonat reiches Mineralwasser (keine künstlichen, weil diese zu viel andere Säuren außer Kohlensäure enthalten), wenn man eine rasche und intensive Wirkung erzielen will. Sonst ist unter allen Umständen das beste Kalkpräparat: ohne Nähr-

salzverluste zubereitetes grünes Gemüse, vor allem Spinat.[1])

Kohlensaures Calcium in Substanz kommt wohl nur nach Lösung durch die Magensäure als $CaCl_2$, u. U. zum geringeren Teil wohl auch als Laktat zur Wirkung. Dagegen wird das gelöste Calciumbicarbonat der natürlichen Mineralwässer sicher zum Teil als solches resorbiert werden können und muß dann wie das Laktat wirken; vor diesem hat es jedoch voraus, daß es für seine Assimilation keine Oxydation nötig hat.

Weder Lecithin, Glycerinphosphorsäure, Laktophosphorsäure noch Phytin kommen für die Therapie als Phosphorlieferanten in Frage; hier wird wohl nur der direkt oder indirekt aus dem Pflanzenreich stammende, als Nuclein usw. in den Nahrungsmitteln vorhandene Phosphor zu gebrauchen sein. Das heißt, wenn tatsächlich einmal Phosphormangel vorliegen sollte, was jetzt noch dringend des Beweises bedarf; ich persönlich bin der Ansicht, daß gewöhnlich der Fehler ein umgekehrter sein wird: unsere gewöhnliche Diät enthält viel zu wenig Phosphor,[2]) wenigstens im Verhältnis zu den gleichzeitig eingeführten Alkalien. Das Lecithin kann als appetitanregendes Mittel und vor allem als Aphrodisiacum seine Berechtigung haben, wobei man jedoch zu bedenken hat, daß man es nicht mit einem Nährstoff, sondern mit einem Reizmittel zu tun hat. Für das Phytin könnte höchstens eine Verwendung als appetitanregendes Mittel in Frage kommen, wenn man vorher nach-

---

[1]) In Brüssel machte mir Herr Prof. Wijsman hiergegen privatim den Einwurf, daß manche dieser Gemüsearten, vor allem die Rumexarten einen großen Teil des Calciums in Form von unlöslichem Oxalat enthalten, das für den Organismus nicht verwertbar sei. Demgegenüber sei darauf hingewiesen, daß nach den neuesten Untersuchungen auch bei großen Oxalatgaben über 50 % der Oxalsäure bei der Verdauung spurlos verschwinden. Dies ist wohl der zersetzenden Tätigkeit der Darmflora zuzuschreiben; jedenfalls wird die Anwesenheit von Oxalsäure die Assimilation des Calciums aus diesen Gemüsen nicht viel behindern können.

[2]) Daß die Phosphorwirkung im Phosphoröl oder Phosphorlebertran nur eine Reizwirkung sein kann, braucht man wohl nicht besonders zu betonen!

weist, daß durch den Magensaft aus diesem Mittel freie Phosphorsäure abgespalten werden könnte.

Ich bin mir wohl bewußt, daß es von großem Wert gewesen wäre, wenn ich bei meinen vorliegenden Versuchen die analytische Untersuchung noch weiter ausgedehnt hätte, vor allem auf die genaue Bestimmung der Acidität und der Harnsäuremenge im Harn, sowie auf die Bestimmung der Stickstoff- und Schwefelbilanz. Da ich jedoch einerseits neben diesen Versuchen noch eine andere, auf fast zwei Monate sich ausdehnende Stoffwechseluntersuchung bei einem interessanten Krankheitsfall durchgeführt habe, andererseits diese vorliegende Arbeit allein mit allen Kontrollbestimmungen schon weit über 1500 gewichtsanalytische Bestimmungen erforderte, und ich gezwungen war, diese selbst auszuführen, so wird man verstehen können, daß ich mich auf das für meine Arbeit absolut Notwendige beschränken mußte.

Zur Theorie des isoelektrischen Punktes.

Von

Leonor Michaelis und Heinrich Davidsohn.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 22. November 1910.)

Die Definition des isoelektrischen Punktes und die Theorie der auf Grund der Helmholtz-Bredigschen Anschauung von uns behaupteten Identität von isoelektrischer Konstante und Koagulationsoptimum, die für das Verständnis der folgenden Erörterungen unerläßlich sind, setzen wir als bekannt voraus.

Im Laufe der Zeit ist es jetzt schon bei einer größeren Anzahl amphoterer Elektrolyte von sogenannt kolloidaler Natur geglückt, die Übereinstimmung des isoelektrischen Punktes mit dem Koagulationsoptimum experimentell durch Arbeiten aus unserem Laboratorium erweisen zu können. Dagegen ist der Zusammenhang zwischen isoelektrischem Punkte bzw. dem Koagulationsoptimum und den Dissoziationskonstanten des betreffenden amphoteren Elektrolyten bisher eine experimentell noch nicht bestätigte Theorie, weil wir aus gleich näher zu erörternden Gründen vorläufig stets mit eiweißähnlichen Körpern gearbeitet haben, deren Dissoziationskonstanten nicht bekannt sind. Diese Körper besitzen nämlich den Vorteil, daß sie wegen mangelnder Krystallisation sehr zur Bildung amorpher Flockungen neigen und durch das Fehlen von Übersättigungserscheinungen ausgezeichnet sind. Sie lassen daher das Optimum der Koagulation so deutlich hervortreten, daß wir gar nicht so sehr auf die Menge der ausflockenden Substanz zu achten brauchen wie auf die Geschwindigkeit ihrer Zusammenballung. Diese Erscheinung,

die mit der Oberflächenspannung an der Grenzfläche der ausflockenden Phase zusammenhängt, ist bei amorphen Substanzen viel klarer definiert als bei Krystallen, wo die Beobachtung von Wirkungen der Oberflächenspannung infolge der „vektoriellen Kräfte" getrübt wird.

Trotz dieser zutage liegenden Schwierigkeiten haben wir das Bedürfnis empfunden, unsere Theorie an exakt definierten, amphoteren Elektrolyten zu prüfen, deren Säure- und Basendissoziationskonstante bekannt ist.

Zur Lösung dieses Problems ergab sich für uns folgende Versuchsanordnung: Wir wählen zum Versuch einen an sich schwer löslichen, gut bekannten amphoteren Elektrolyten, etwa eine schwer lösliche Aminosäure und bringen gleiche Mengen dieser Substanz bei gleichem Gesamtvolumen in verschiedene Lösungen mit wechselnder Wasserstoffionenkonzentration. Wenn unsere Voraussetzungen richtig sind, so muß man bei dieser Anordnung einen Wendepunkt in dem Verhalten der untersuchten Substanz feststellen können; und dieser Wendepunkt wird dadurch charakterisiert sein, daß entweder die vorher gelöste Substanz am schnellsten resp. am reichlichsten auskrystallisiert, oder daß die vorher ungelöste Substanz ein Minimum von Löslichkeit besitzt. Das Krystallisationsoptimum müßte dann ebenso wie das Lösungsminimum dem Flockungsoptimum der amorphen Substanzen, d. h. ihrem isoelektrischen Punkt entsprechen. Als Beweis für die Richtigkeit dieser Theorien ist zu verlangen, daß der so beobachtete isoelektrische Punkt J identisch ist mit dem nach der früher entwickelten Formel

$$R = \frac{J^2}{K_w} \text{ oder } J = \sqrt{R \cdot K_w}$$

berechneten, in der

$$R = \frac{K_A}{K_B}$$

zu setzen ist.

Im groben sind diese Anschauungen rein empirisch längst bestätigt worden. Berechnen wir z. B. den isoelektrischen Punkt des Tyrosins nach den vorhandenen Dissoziationskonstanten (bei 25°)

$$K_A = 4 \cdot 10^{-9}$$

und

$$K_B = 2{,}6 \cdot 10^{-12},$$

so finden wir ihn bei rund $4 \cdot 10^{-6}$.[1]) Und in der Tat weiß der präparative Chemiker, daß die beste Ausbeute an Tyrosin bei minimal saurer Reaktion erreicht wird.

Sobald wir aber an eine feinere Bestimmung des isoelektrischen Punktes bei diesen Substanzen gehen, stoßen wir auf große Schwierigkeiten. Die bekannten Übersättigungserscheinungen des Tyrosins lassen es sogar von vornherein als aussichtslos erscheinen, ein scharfes Krystallisationsoptimum für dieses festzustellen. Wir wissen nämlich aus Untersuchungen an andern Körpern, daß die Krystallisierung infolge der leicht eintretenden Übersättigung in ganz unregelmäßiger Weise zu beiden Seiten des Optimums sich vollzieht, wenn man auf eine Impfung verzichtet; impft man aber, so erfolgt die Krystallisierung in einem relativ so weiten Bereiche fast gleichzeitig, daß die Bestimmung des Optimums sehr ungenau ausfällt.

Nach vielem Suchen fanden wir einen für unsere Zwecke geeigneten amphoteren Elektrolyten in der p-Aminobenzoesäure. Wenn man diese Substanz in Natronlauge löst und steigende Mengen Essigsäure hinzufügt, so läßt sich, wenn die Konzentration der Aminobenzoesäure passend gewählt ist, eine ganz bestimmte Acidität als das Optimum für die Krystallisierung der freien Aminobenzoesäure erkennen. Ist die Gesamtkonzentration der Aminobenzoesäure zu gering gewählt, so findet überhaupt keine Krystallisation statt, ist sie zu groß, so ist das Aciditätsbereich, in dem Krystallisation auftritt, zu breit, um ein scharfes Optimum zu zeigen.

Eine große Schwierigkeit besteht darin, die Wasserstoffionenkonzentration in rationell abgestufter Weise um den isoelektrischen Punkt auf- bzw. absteigen zu lassen. Bei den Eiweißkörpern hatten wir den Vorteil, daß wir sie in minimaler Konzentration anwenden konnten. Es war deshalb ihr säure- bzw. basenbindendes Vermögen zu vernachlässigen und die Herstellung der Wasserstoffionenkonzentration durch Anwendung von Regulatoren leicht möglich. Bei den krystallinischen Körpern dagegen müssen wir, um zu klarem Resultate zu kommen, die zu untersuchende Substanz in einer viel größeren absoluten,

[1]) Die Dissoziationskonstanten sind sämtlich angegeben nach Harald Lundén, Affinitätsmessungen an schwachen Säuren und Basen. Stuttgart 1908.

geschweige denn molaren Konzentration gebrauchen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß bei manchen amphoteren Elektrolyten der berechnete isoelektrische Punkt bei einer so hohen Acidität resp. Alkalität liegt, wie sie nur noch mit verdünnten Salzsäure- und Natronlaugelösungen zu erreichen ist. Es ist verständlich, daß in solchen Fällen die durch Säure- bzw. Basenbindung bedingte Veränderung sehr groß sein wird und die feine und rationelle Abstufung der Wasserstoffionenkonzentration kaum auszuführen ist.

Bei der p-Aminobenzoesäure waren diese Schwierigkeiten noch relativ gering. Trotzdem wurde in jedem einzelnen Röhrchen die Wasserstoffionenkonzentration nicht allein durch Berechnung aus der vorhandenen Essigsäure und Natronlauge (umgerechnet auf Natriumacetat + Essigsäure), sondern auch durch Gaskettenmessung bestimmt.

Durch eine Anzahl von Vorversuchen stellten wir fest, daß eine 8%ige Lösung von p-Aminobenzoesäure in n-NaOH sich für unseren Zweck am besten eignet. Gleiche Teile dieser Lösung wurden mit steigenden Mengen Essigsäure versetzt und bei Zimmertemperatur das Optimum der Krystallisation beobachtet. Über einen derartigen Versuch gibt Tabelle I Aufschluß.

Tabelle I.

Röhrchen	1	2	3	4	5
[H] gemessen	$4{,}3 \cdot 10^{-6}$	$3{,}2 \cdot 10^{-5}$	$6{,}9 \cdot 10^{-5}$	$1{,}6 \cdot 10^{-4}$	$3{,}0 \cdot 10^{-4}$
Wasser	2,4	2,2	1,8	1,0	1,0
3,75 n-Essigsäure .	0,2	0,4	0,8	1,6	—
7,5 n-Essigsäure .	—	—	—	—	1,6
8%ige Aminobenzoesäure in $^n/_1$-NaOH	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Krystallisation ist deutlich	gar nicht	gar nicht	nach 3 Min.	nach 1 Min.	gar nicht

Aus diesem Versuch haben wir das Optimum der Krystallisation unter Zugrundelegung der mit Gaskettenmessung bestimmten Werte für die Wasserstoffionenkonzentration auf $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ berechnet. Die Genauigkeit dieser Zahl ist dahin zu definieren, daß $7 \cdot 10^{-5}$ (in Röhrchen 3) sicher zu klein, $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ (in Röhrchen 5) sicher zu groß ist. Mehrere Parallelversuche ergaben ein ganz entsprechendes Resultat.

Die Dissoziationskonstanten für die p-Aminobenzoesäure sind nun (eigentlich für 25° C, angenähert aber auch für 18° C)

$$K_A = 1{,}21 \cdot 10^{-5}$$

und

$$K_B = 2{,}33 \cdot 10^{-12}.$$

Aus ihnen läßt sich mit Hilfe der bereits genannten Formel der isoelektrische Punkt berechnen (K_w ist als $0{,}58 \cdot 10^{-14}$ angenommen), er beträgt

$$J = 1{,}7 \cdot 10^{-4}$$

und zeigt mit dem von uns gefundenen Wert $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ eine befriedigende Übereinstimmung, zufällig noch besser befriedigend, als sie bei der groben Abstufung der Versuchsreihe zu verlangen gewesen wäre.

Gleich gute Resultate erzielten wir mit der m-Aminobenzoesäure, deren Dissoziationskonstanten

$$K_A = 1{,}63 \cdot 10^{-5}$$

und

$$K_B = 1{,}22 \cdot 10^{-11} \text{ sind.}$$

Daher ist hier

$$J = 8{,}8 \cdot 10^{-5}.$$

Der Unterschied zwischen dem isoelektrischen Punkt dieser und der vorher genannten Aminobenzoesäure ist nicht bedeutend, aber doch so groß, daß wir in Anbetracht der Feinheit unserer Methoden auf einen deutlichen Ausschlag rechnen konnten, wenn unsere Theorie richtig war.

Bei der m-Aminobenzoesäure erwies es sich am günstigsten, mit einer 13%igen Lösung der Substanz in Normalnatronlauge zu arbeiten. Im übrigen verfuhren wir, wie vorher angegeben ist. Wir stellten zunächst durch Vorversuche fest, daß das Krystallisationsoptimum dieses Körpers in der Tat in der Nähe des vorher berechneten isoelektrischen Punktes liegt, und bestimmten dann durch einen Versuch, in dem die H-Ionenkonzentration jedes Röhrchen zur Kontrolle noch mit Gasketten gemessen wurde, das Krystallisationsoptimum zu $6{,}3 \cdot 10^{-5}$. Die Übereinstimmung dieses Wertes mit dem berechneten isoelektrischen Punkt ist durchaus befriedigend. Über diesen Versuch gibt Tabelle II Aufschluß.

Tabelle II.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6
[H·] gemessen	$0{,}8 \cdot 10^{-5}$	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	$6{,}3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	$2{,}7 \cdot 10^{-4}$
Wasser	1,5	1,4	1,2	0,8	—	—
3,75 n-Essigsäure .	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	—
7,5 n-Essigsäure . .	—	—	—	—	—	1,6
13%ige m-Aminobenzoesäure in $^n/_1$-NaOH . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Beginn der Krystallisation nach			2 Min.	$1^1/_2$ Min.	$2^1/_2$ Min.	
Nach 7 Min. . . .	0	0	dicht	sehr dicht	spärlich	0
„ 20 „ . . .	0	spärlich	dicht	sehr dicht	reichlich	0

Ein Parallelversuch ergab dasselbe Resultat.

Größeren Schwierigkeiten begegneten wir bereits bei Versuchen mit der Asparaginsäure, da wir hier Salzsäureverdünnungen anwenden mußten. Wir stellten uns eine 10%ige Lösung von Asparaginsäure in Normalnatronlauge her und fügten zu gleichen Teilen dieser Lösung zunächst konzentrierte Salzsäure bis zu einer ungefähr an den berechneten isoelektrischen Punkt heranreichenden Säuerung, um nachher mit $^n/_{10}$-Salzsäure feiner abzustufen. Einen derartigen Versuch gibt Tabelle III wieder.

Tabelle III.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7
Wasser .	2,4	2,2	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2
Salzsäure 1 : 4 verdünnt .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$^n/_{10}$-Salzsäure . .	—	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
10%ige Asparaginsäure in $^n/_1$-NaOH	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Krystallisation nach 2 Min.	0	0	0	0	0	beginnend	0
„ 5 „	0	0	0	0	0	stark	0
„ 15 „	reichlich	beginnend	beginnend	gering	beginnend	stark	beginnend
„ 20 „	stark	mittel	beginnend	reichlich	mittel	stark	gering

Wir ersehen aus dieser Tabelle, daß um das Optimum herum die Krystallisation so unregelmäßig erfolgt, daß man beim

Zustandekommen des Optimums einen Zufall nicht immer ausschließen kann. Außerdem bringen es die Versuchsfehler mit sich, daß mitunter 1 Tropfen Salzsäure zu viel oder zu wenig abgemessen wird; 1 Tropfen verdünnter Salzsäure ändert aber die Wasserstoffionenkonzentration bereits so bedeutend, daß das Optimum nicht sehr scharf definiert werden kann. In grober Annäherung haben wir feststellen können, daß das Krystallisationsoptimum zwischen $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ und $7{,}6 \cdot 10^{-5}$ liegt. Das arithmetische Mittel aus diesen beiden Werten beträgt $4 \cdot 10^{-4}$, während aus den Dissoziationskonstanten

$$K_A = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$$

und

$$K_B = 1{,}2 \cdot 10^{-12}$$

$$J = 8{,}7 \cdot 10^{-4}$$

berechnet wird, also eine Übereinstimmung, die in Anbetracht der erwähnten Schwierigkeiten befriedigend ist.

Schlechte Resultate hatten wir beim Theobromin, bei dem wir auf Grund einiger entsprechender orientierender Versuche das Krystallisationsoptimum bei ungefähr $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ fanden, während der isoelektrische Punkt auf

$$J = 6{,}0 \cdot 10^{-6}$$

zu berechnen ist. Das liegt aber wohl daran, daß es mit den Dissoziationskonstanten des Theobromins eine eigene Bewandtnis hat. Es ist bekannt, daß die Körper der Puringruppe eine Tautomerie zwischen der sogenannten Laktam- und Laktimform zeigen. Man kann deshalb wohl annehmen, daß die Alkalisalze des Theobromins in der einen, die Chlorhydrate in der andern Form existieren.

Wird nun nach den bisher üblichen Methoden am Theobrominnatrium eine Bestimmung der Dissoziationskonstante des negativen Theobrominions gemacht, so bezieht sich diese natürlich nur auf diejenige Theobrominabart, die in alkalischer Lösung vorhanden ist. Das Umgekehrte gilt in entsprechender Weise, wenn man die Dissoziationskonstante des Theobrominkations aus dem Chlorhydrat bestimmt. Dasjenige Theobromin, das beim Krystallisationsoptimum ausfällt, ist aber höchstwahrscheinlich seiner chemischen Konstitution nach nur mit einem

der beiden identisch. Die K_A- und K_B-Werte, die wir zu unserer Berechnung brauchen, stimmen dann nicht mit den bekannten überein, daher die Inkongruenz.

Eine letzte Versuchsreihe, die wir mit der arsenigen Säure machten, mißlang völlig, da Krystallisation und Lösung bei ihr in ganz unscharfer Weise eintraten, so daß die Bestimmung eines Optimum nicht möglich war.

Wir haben also bisher unsere Theorie lediglich an den n-Aminobenzoesäuren in befriedigender Weise bestätigen können. Diese schlechte Ausbeute wird aber verständlich, wenn wir uns fragen, welche Eigenschaften ein amphoterer Elektrolyt haben muß, um sich für unsere Versuche zu eignen.

Es ist dafür einmal notwendig, daß der isoelektrische Punkt des betreffenden Elektrolyten nicht gar zu weit von der Neutralität entfernt liegt. Die Wasserstoffionenkonzentration kann nämlich bei Anwesenheit säure- oder alkalibindender Substanzen durch die Anwendung der Regulatorgemische am besten bei geringer oder mäßiger Alkalität und Acidität hergestellt und reproduziert werden. Eine zweite wichtige Bedingung besteht darin, daß die absolute Größe der Dissoziationskonstanten nicht zu gering ist. Je größer z. B. der absolute Wert der Säuredissoziationskonstante ist, um so leichter wird sich dieser Körper in einem geringen Überschuß von Alkali lösen und um so schärfer wird das Löslichkeitsminimum und das Krystallisationsoptimum hervortreten.

Leider kennen wir zurzeit keine anderen geeignet erscheinenden amphoteren Elektrolyte mit bekannten Dissoziationskonstanten, um weitere Versuche anzustellen. Wir hoffen aber, in Zukunft noch andere Beispiele außer den beiden Aminobenzoesäuren zur Erhärtung der Theorie zu finden.

Zusammenfassung.

Bei geeigneten schwer löslichen amphoteren Elektrolyten, nämlich bei m- und bei p-Aminobenzoesäure, ließ sich erweisen, daß das Krystallisationsoptimum bzw. das Löslichkeitsminimum mit dem isoelektrischen Punkt zusammenfällt.

Oxydation mehrwertiger Alkohole und ihrer Aldehyde bzw. Ketone durch Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung.

Vorläufige Mitteilung.

Von

W. Greifenhagen.

(Aus dem Laboratorium der agrikulturchemischen Versuchsstation in Münster i. W.)

(Eingegangen am 25. November 1910.)

Unabhängig von den Arbeiten von Frl. Denis[1]) und der Herren G. W. Heimrod und P. A. Levene[2]) habe ich mich seit einiger Zeit mit der Oxydation mehrwertiger Alkohole und ihrer Aldehyde bzw. Ketone durch Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung befaßt. Dabei habe ich gefunden, daß diese in starker alkalischer Lösung und mit einem genügenden Überschuß von Kaliumpermanganat zu Oxalsäure und Kohlensäure verbrennen und sich bei Anwendung einer eingestellten Permanganatlösung unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure, nach der Oxydation in alkalischer Lösung, auch leicht titrimetrisch bestimmen lassen.

Daß eine Oxydation in saurer Lösung allein, wie Karez[3]) behauptet, zu richtigen Resultaten führen sollte, habe ich nicht bestätigen können. Die Bildung der Oxalsäure und Kohlensäure in der alkalischen Lösung erfolgt quantitativ und ist abhängig von den vorhandenen Alkoholgruppen einerseits und den Aldehyd- und Ketongruppen andererseits. Darüber werde ich später ausführlich berichten.

---

[1]) Chem. Journ. 38, 561, 1907.

[2]) Diese Zeitschr. 29, 31, 1910.

[3]) Österr. Zeitschr. f. Zuckerindustrie 20, 698, 1891.

Über das Verhalten von Penicillium gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen.

Von

Johannes Reichel (Pankow).

(Eingegangen am 25. November 1910.)

In Kulturen von Penicillium glaucum auf verschiedenen organischen Stoffen als Kohlenstoffquelle erregte besonders das Verhalten des Pilzes auf Essigsäure und Acetaten mein Interesse. Unter anderem fand ich für Penicillium zwei Sätze bestätigt, die kürzlich Paul, Birstein und Reuß[1]) für Staphylokokken in dieser Zeitschrift aufgestellt haben. Diese wiesen in ihrer eingehenden Arbeit über die Kinetik der Giftwirkung gelöster Stoffe nach, daß die Desinfektionswirkung der Essigsäure viel stärker ist als diejenige von anorganischen Säuren in isohydrischer Lösung; und ferner fanden sie, daß eine wässerige Lösung, die äquivalente Mengen der Säure HX_1 und des Salzes MeX_2 enthält, annähernd die Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante der Säure HX_2 hat. Die folgenden Zeilen waren schon geschrieben, als ich Kenntnis von der genannten Arbeit erlangte. Sie mögen nun auch so bleiben, wie sie sind, trotzdem ich manches anders darstellen würde, wenn ich heute erst über meine Versuche berichten würde.

Aus den Versuchen (s. Tabelle) geht zunächst hervor, daß die freie Essigsäure einen deutlich schädigenden Einfluß auf die Entwicklung von Penicillium ausübt. Bei sehr geringer Konzentration macht sich die Wirkung darin geltend, daß der Beginn der Sporenbildung etwas hinausgeschoben wird; bei etwas stärkerer Konzentration (Vers. 4 bis 11) werden auch nach

[1]) Theodor Paul, Gustav Birstein, Anton Reuß, diese Zeitschr. 29, 202, 1910.

11 Tagen noch keine Sporen hervorgebracht, und bei noch stärkerer (Vers. 12, 13) ist auch das Wachstum des Pilzes selbst auf den besten Nährböden unmöglich gemacht. In qualitativen Versuchen wuchs er weder auf Essigsäure als Kohlenstoffquelle allein noch auch auf Essigsäure mit Traubenzucker, Rohrzucker, Weinsäure, Alkohol und Aluminiumacetat zusammen, obwohl diese Stoffe an und für sich gute oder wenigstens brauchbare Kohlenstoffquellen für den Pilz sind. Die freie Essigsäure wirkt von einer bestimmten Konzentration an demnach als tödliches Gift.

Tabelle.

Über die Konzentration der H-Ionen in Kulturen von Penicillium glaucum angegeben in Bruchteilen von normaler Konzentration.

Nr.	Kohlenstoffquelle (außer Zucker)	Acidität am Anfang des Versuchs	Acidität nach 5 Tg.	Acidität nach 6—7 Tg.	Acidität nach 9—11 Tg.	Bemerkung
1	Traubenzucker	0,0096	—	—	0,0112	
2	„	0,1100	—	—	0,1116	
3	Kaliumacetat	0,0084	—	0,0016 alk.		kein Zucker
4	Essigsäure	0,0123	—	0,0140	—	
5	„	0,0130	—	0,0147	—	
6	„	0,0204	0,0112	0,0222	0,0232	
7	„	0,0288	0,0169	—	—	
8	„	0,0318	—	0,0243	0,0220	
9	„	0,0337	—	0,0284	0,0228	
10	„	0,0368	—	0,0152	—	
11	„	0,0420	—	0,0262	—	
12	„	0,0940	—	kein Wachstum		
13	„	0,2996	—	desgl.		
14	Kaliumacetat	0,0088	—	—	0,0112	
15	Natriumacetat	0,0100	—	—	0,0068	
16	„	0,0168	0,0141	0,0068	0,0087	Sporen
17	„	0,0168	0,0141	0,0067	0,0095	„
18	„	0,0196	0,0140	—	0,0078	
19	„	0,0196	—	0,0135	0,0080	
20	„	0,0369	—	0,0226	0,0113	
21	„	0,0395	0,0336	0,0278	0,0092	
22	„	0,0404	0,0218	0,0080	0,0113	„
23	„	0,0404	—	0,0096	0,0065	fast keine Sporen
24	„	0,0436	—	0,0294	0,0117	
25	„	0,0768	—	—	kein Wachstum	
26	„	0,0920	—	—	desgl.	0,0935
27	„	0,1156	—	—	desgl.	m. Weinsäure angesäuert
28	„	0,1502	—	—	desgl.	

Daher kann sie auch als Konservierungsmittel benutzt werden. Es wurde beispielsweise ein Stück Brot mit Essigsäure getränkt und dann unter einer Glasglocke bei Bedingungen gehalten, bei denen auf nicht oder mit Weinsäure getränkten Stücken eine massenhafte Entwicklung von Schimmelpilzen eintrat. Das essigsaure Stück blieb dann völlg frei von Pilzen und anscheinend auch anderen Mikroorganismen, denn es war noch nach 2 Monaten von angenehmem Geruche wie ein frisches Stück. Nebenbei sei bemerkt, daß auch freie Ameisensäure das Wachstum von Penicillium verhinderte. Es wäre also wohl möglich, daß den Ameisen ihre Ameisensäure nicht nur als Verteidigungsmittel dient, sondern auch gebraucht wird, um ihren Bau von allerhand Mikroorganismen frei zu halten.

Wenn man die schädliche Wirkung dieser Säuren erklären will, so wird man zunächst geneigt sein, einfach die stark saure Reaktion der Nährlösung dafür verantwortlich zu machen, bzw. man wird die Schuld der übermäßigen Konzentration der H-Ionen zuschreiben. Man überzeugt sich aber leicht, daß man damit den H-Ionen unrecht tut. Penicillium kann eine ganz beträchtliche saure Reaktion sehr gut vertragen. Er gedeiht vorzüglich auf Lösungen, die saurer sind als diejenige Essigsäurelösung, die ihm das Leben unmöglich macht (Vers. 2 und 9). In den qualitativen Versuchen wuchs der Pilz auch auf Lösungen, die Schwefelsäure, Salzsäure, Weinsäure und Oxalsäure in teilweise recht bedeutenden Mengen enthielten. Die Ursache für die schädliche Wirkung der freien Essigsäure darf also nicht in der H-Ionenkonzentration erblickt werden.

Ebensowenig kann nun aber auch bei den Acet-Ionen von einer schädigenden Wirkung die Rede sein; denn von den verschiedensten Acetaten ist bekannt, daß sie nicht nur unschädlich, sondern sogar brauchbare Kohlenstoffquellen für Penicillium sind. So gedieh er in meinen Kulturen prächtig bis zur Bildung von reichlichen Sporen auf den Acetaten des Kaliums, Natriums, Ammoniums, Calciums und Aluminiums. Wenn er auf Bleiacetat auch mit Zucker zusammen nicht auskeimt, so ist diese Wirkung zweifellos nicht den Acet-Ionen, sondern den Blei-Ionen zuzuschreiben.

Wie wir also eben geschlossen haben, daß die H-Ionen nicht die Ursache der Giftwirkung der Essigsäure sind, so müssen wir jetzt aus der Möglichkeit des Wachstums auf Acetaten folgern, daß auch die Acet-Ionen eine unüberwindliche giftige Wirkung nicht ausüben.

Wenn nun in einer freie Essigsäure enthaltenden Lösung weder die H-Ionen noch die Acet-Ionen die schädlichen, resp. tödlichen Bestandteile sind, so muß es notwendigerweise die undissoziierte freie Essigsäure sein. Als schwache Säure ist ja die Essigsäure nur in geringem Maße in ihre Ionen gespalten, und in jeder essigsauren Lösung ist die Hauptmenge der Essigsäure in undissoziiertem Zustande zugegen. Bei essigsauren Salzen verhält sich die Sache dagegen anders. Sie sind weitgehend dissoziiert, und wenn ihr undissoziierter Bestandteil gleich der undissoziierten Essigsäure selbst schädlich wirken sollte, so ist er doch in so geringer Konzentration vorhanden, daß die Schädigung überwunden werden kann. Bei der freien Säure dagegen ist die Konzentration des undissoziierten Bestandteiles so erheblich, daß er für die Wirkung einer essigsauren Lösung sehr wohl verantwortlich gemacht werden kann. Daraus ist zu schließen: nicht die H-Ionen und nicht die Acet-Ionen, sondern die undissoziierte Essigsäure wirkt schädlich.

Ist dieser Schluß richtig, so müssen nach der Ionentheorie essigsaure Salze in saurer Lösung dargereicht dieselbe Wirkung ausüben wie die freie Essigsäure selbst. Denn es treten dann die H-Ionen und die Acet-Ionen zu undissoziierter Essigsäure zusammen, und diese kann nun ihre Giftwirkung ausüben. Und zwar ist in einer sauren Lösung, die ein Acetat im Überschuß enthält, die Menge der undissoziierten Essigsäure ebenso groß wie in einer mit freier Essigsäure angesäuerten Lösung von derselben Acidität. Ist nun die Menge der undissoziierten Essigsäure das Maßgebende für die Wirkung auf den Pilz, so muß auch diese Wirkung in beiden Fällen dieselbe sein. Die Versuche zeigen, daß dies durchaus der Fall ist. Der Pilz verhält sich auf einer mit Essigsäure bis zu einer bestimmten Acidität angesäuerten Lösung bis ins einzelne genau so wie auf einer Lösung, die Kalium- oder Natriumacetat im Überschuß enthält und dann mit Schwefelsäure bis zu der entsprechenden Acidität angesäuert ist.

So fand beispielsweise noch Auskeimen von Sporen und Wachstum des Mycels statt auf einer Lösung, die mit Essigsäure 0,0420 normal sauer gemacht war; auf einer 0,0940 normal sauren Lösung dagegen konnten Sporen von Penicillium nicht mehr auskeimen. Ganz entsprechend war auch auf einer mit Schwefelsäure 0,0436 normal sauer

gemachten Natriumacetatlösung Wachstum möglich, auf einer 0,0920-normal sauren Lösung aber nicht. Besonders bemerkenswert sind hierbei noch die Versuche, in denen nicht mit Schwefelsäure, sondern mit Weinsäure angesäuert wurde, weil diese an sich ein brauchbares Nahrungsmittel ist. Trotzdem fand auf einer Lösung, die Rohrzucker, Natriumacetat und Weinsäure enthielt und 0,1156 normal sauer war, in 10 Tagen nicht das geringste Auskeimen von Sporen statt. Nochmals sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß auf einer 0,1100 normal sauren Traubenzuckerlösung das denkbar beste Wachstum vor sich ging. Im Falle unserer Zucker-Acetat-Weinsäurelösung haben wir dagegen die eigentümliche Erscheinung, daß der Pilz nicht leben kann, obwohl ihm sogar drei an sich brauchbare Stoffe als Kohlenstoffquelle dargeboten werden. Das kann doch nur so erklärt werden, daß die Stoffe chemisch miteinander reagieren und einen neuen Stoff bilden, der giftig wirkt. Im vorliegenden Falle entstehen nun als neue Stoffe nur weinsaures Natrium in geringer Menge und ziemlich viel Essigsäure. Von diesen Stoffen kommt als Ursache der wachstumhindernden Wirkung der erste nicht in Betracht; denn auf weinsaurem Natrium allein wächst der Pilz ausgezeichnet. Die Giftwirkung muß also auf den zweiten Stoff zurückgeführt werden: die undissoziierte Essigsäure.

Daß die in wässeriger Lösung sich bildenden Ionen einer chemischen Verbindung eine physiologisch so ganz andere Wirkung haben sollen als die ungespaltene Verbindung selbst, mag vielleicht auf den ersten Blick etwas befremden. Wenn man sich aber vergegenwärtigt, daß auch in chemischer und physikalischer Hinsicht die Ionen grundverschieden von der ungespaltenen Verbindung sind, so muß es geradezu selbstverständlich erscheinen, daß es in physiologischer Hinsicht genau ebenso der Fall ist.

Wir haben also gesehen, daß es vollkommen gleichgültig ist, ob wir zu einer Nährlösung Essigsäure zusetzen, oder ob wir sie erst entstehen lassen, indem wir ein Acetat zusetzen und dann mit irgendeiner Säure ansäuern. Immer bestätigt sich die Regel: je saurer die Lösung, um so größer die Schädigung; und immer reagiert der Pilz nach Maßgabe dieser Schädigung. Die Art dieser Reaktion verdient es nun aber, noch etwas genauer betrachtet zu werden. Man erkennt dann nämlich ein regulatorisches Verhalten des Pilzes, das überraschend ist. Es besteht dies darin, daß der Pilz auf einer Essigsäure enthaltenden Lösung, sofern auf ihr überhaupt noch Wachstum möglich ist, selbsttätig die Acidität der Lösung auf ein gewisses geringes Maß herunterbringt; und so erreicht er

also, daß die Menge der schädlichen Essigsäure auf ein weniger schädliches oder unschädliches Maß herabgemindert wird. In etwa 8 Tagen hat der Pilz in allen Fällen diese Leistung vollbracht, mag die ursprüngliche Lösung nun ziemlich stark oder nur sehr wenig sauer gewesen sein.

So wurde beispielsweise im Versuch 22 eine Lösung, die 0,0404 normal sauer war, in dieser Zeit auf eine Acidität 0,0080 heruntergebracht; und in genau derselben Zeit war eine ursprünglich 0,0168 normal saure Lösung im Versuch 16 0,0067 normal sauer geworden. Daraus geht hervor, daß die Reduktion der Acidität im ersten Fall viel energischer betrieben worden ist, als im zweiten. Ist schießlich die Nährlösung so wenig sauer geworden, daß die undissoziierte Essigsäure nur noch in unschädlicher Menge vorhanden ist, so hört eine weitere Reduktion des Säuregehaltes auf. Die Versuche lassen mithin ein Verhalten des Pilzes erkennen, wie es zweckmäßiger nicht gedacht werden kann.

Über die Mittel, die dem Pilz zur Verfügung stehen, um die Acidität seiner Nährlösung in einer bestimmten Richtung zu beeinflussen, kann man nach einer im Pfefferschen Institut ausgeführten Arbeit von Nikitinsky[1]) kaum im Zweifel sein.

Wird nämlich dem Pilz Zucker (bzw. Weinsäure, Glycerin, Alkohol usw.) als Kohlenstoffquelle geboten, so wird die Nährlösung etwas saurer (Vers. 1, 2). Es kann dies darauf zurückgeführt werden, daß beim Abbau der NH_4-Ionen des zugesetzten anorganischen Ammoniumsalzes diese in H-Ionen übergehen (Penicillium ist im Gegensatz zu Aspergillus nicht imstande, Oxalsäure oder eine andere organische Säure zu produzieren). Ist dagegen der Pilz auf das Salz einer organischen Säure als Kohlenstoffquelle angewiesen, z. B. auf ein Acetat, so wird dabei die saure Reaktion sehr rasch herabgesetzt und geht bald in alkalische Reaktion über. Außer in dem angeführten Versuch 3 wurde alkalische Reaktion auch auf sämtlichen anderen angewandten Acetaten sowie auch auf Ammoniumtartrat und Calciumcitronat beobachtet. Diese Tatsache ist vermutlich wiederum darauf zurückzuführen, daß die Ionen des organischen Säurerestes in OH-Ionen übergehen. Indem nun viel mehr Ionen des Säurerestes als Kohlenstoffquelle verkonsumiert werden müssen als NH_4-Ionen zur Deckung des Stickstoffbedarfs, entstehen auch viel mehr OH-Ionen als H-Ionen, und die Lösung muß alkalisch werden. Sind nun dem Pilz gleichzeitig Zucker und eine organische Säure zur Nahrung vorgesetzt, so besteht für ihn die Möglichkeit, die Acidität seiner Nährlösung zu regulieren, je nachdem er mehr oder weniger die organische Säure zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs neben dem Zucker mit heranzieht.

Wir dürfen also wohl annehmen, daß die von uns beobachtete Regulierung der Acidität tatsächlich durch entsprechenden

[1]) J. Nikitinsky, Jahrb. f. wiss. Botanik, 40, 1904.

Verbrauch der Acet-Ionen als Kohlenstoffquelle und nicht etwa in anderer unbekannter Weise erreicht wird. Die Berechtigung dieser Annahme kann dadurch bewiesen werden, daß man die Menge der verbrauchten Nährstoffe direkt quantitativ bestimmt. Solche Bestimmungen sind indes von mir bisher noch nicht ausgeführt worden. Betreffs des Mittels, dessen sich unser Pilz zur Regulierung der Acidität in den Versuchen bedient hat, sind wir also auf die angegebene, gewiß recht wahrscheinliche Annahme eines entsprechend starken Verbrauches von Acetat angewiesen; die Regulierung selbst dagegen hat sich als Tatsache erwiesen.

Wenn der Schluß von der Tatsache der Aciditätsregulierung auf das Mittel zu ihrer Erreichung eben als logisch nicht vollkommen streng hingestellt worden ist, so kann von dem umgekehrten Schluß das Gegenteil behauptet werden. Aus dem Verbrauch von Acetat dürfen und müssen wir auf eine entsprechende Aciditätsherabsetzung schließen. Wenden wir diesen umgekehrten Schluß an, so setzt er uns in den Stand, einen eigentümlichen Versuch von Pfeffer zu erklären. Pfeffer[1]) hat nämlich gefunden, daß im allgemeinen bei der Darreichung von zwei Kohlenstoffquellen der Pilz in ganz überwiegendem Maße die besser nährende konsumiert, so daß die schlechtere durch die bessere geschützt wird. Von dieser allgemeinen Regel fand Pfeffer nun aber eine bemerkenswerte Ausnahme. Wurde nämlich Calciumacetat und Dextrose dem Pilz angeboten, so wurde auch das schlechter nährende Acetat in verhältnismäßig sehr bedeutender Menge verzehrt. Es hat also den Anschein, als ob hier der Pilz nicht wie sonst in zweckmäßiger Weise seine Ernährung reguliert hätte. Auf Grund unserer vorstehenden Ausführungen können wir jedoch verstehen, daß der Pilz in diesem Falle gerade in ganz besonders bewundernswerter Weise regulatorisch tätig war. Denn da die Acetatlösung, die Pfeffer verwandte, wegen ihres Gehaltes an Asparagin und Monokaliumphosphat sauer war, so war auch die schädliche undissoziierte Essigsäure da. Indem nun der Pilz verhältnismäßig viel von dem Acetat verbrauchte, setzte er in der uns bekannten Weise die Acidität der Lösung herab oder ver-

[1]) W. Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Botanik, 28, 1895.

hinderte wenigstens ein weiteres Sauerwerden und damit die Bildung weiterer undissoziierter Essigsäure. Ja, die Vermutung ist gewiß nicht von der Hand zu weisen, daß der Pilz die beiden gebotenen Nährstoffe sogar stets in einem gewissen optimalen Verhältnis verzehrt. Würde er mehr Zucker verzehren und weniger Acetat, so würde wegen der stärkeren Säuerung mehr der schädlichen Essigsäure entstehen; würde er aber mehr Acetat und weniger Zucker verzehren, als er tatsächlich tut, so würde das Wachstum vielleicht wegen des schlechteren Nährwertes des Acetats oder auch wegen der sich einstellenden Alkalität ein geringeres sein. So besteht ein optimales Verhältnis, in dem Zucker und Acetat genossen das beste Wachstum verbürgen; und ich glaube, daß der Pilz in der Tat die Nährstoffe in diesem Verhältnisse aufnimmt.

Bemerkungen zu der Tabelle.

Penicillium glaucum wurde in allen Versuchen auf einer Nährlösung gezogen, die in 100 ccm Wasser enthielt: 0,05 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,05 g K_2HPO_4, 0,03 g $MgSO_4$, 0,01 g $CaCl_2$. Ferner waren in allen Fällen bis auf Versuch 3 noch 1 bis 2 g Trauben- oder Rohrzucker außer den in der Tabelle genannten Substanzen geboten. Das Acetat wurde in Mengen von 1 g auf 100 ccm Wasser geboten. In den Versuchen 2, 14 bis 26, 28 wurde mit Schwefelsäure bis zu der angegebenen Acidität angesäuert; in Versuch 27 geschah das mit Weinsäure. Die Nährlösungen wurden vor Aussaat der Sporen zum Sieden erhitzt. Die Kulturen wurden dann bei Zimmertemperatur unter übrigens gleichen Umständen in Kochflaschen mit Watteverschluß gehalten. Der Säuregehalt der Nährlösungen wurde durch Titrieren mit Phenolphthalein festgestellt. Die Verfolgung der Acidität über die angegebene Zeit hinaus ist dadurch erschwert, daß dann unter der Wirkung des Pilzes die Nährlösung beginnt, eine orangegelbe Färbung anzunehmen. Zu den Versuchen 22 und 23 sei noch hinzugefügt, daß im Versuch 22 sich ziemlich viel Sporen entwickelt hatten, im Versuch 23 aber fast gar keine. Danach hat es den Anschein, als ob im letzteren Falle zur Bildung der Sporen besonders reichlich Zucker konsumiert worden ist.

Über den Einfluß der Blutkörperchenlipoide auf die Blutbildung.

Von

L. Kepinow (Moskau).

(Aus der biologischen Abteilung des Instituts für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg.)

(Eingegangen am 26. November 1910.)

Seit den grundlegenden Arbeiten von Panum[1]), Worm-Müller[2]), Landois[3]) und Ponfick[4]) über Bluttransfusion ist eine ganze Reihe von Untersuchungen erschienen, die die Therapie der Anämie durch Transfusion zum Gegenstand haben. Quincke[5]) und von Ziemssen[6]) berichteten zuerst über günstige klinische Resultate dieser Behandlungsmethode, die trotz der ablehnenden Haltung seitens einiger Autoren [Grawitz[7]), Naegeli[8]), Köhler[9])] durch weitere Arbeiten [Morawitz[10]), Weber[11]), Enderlen und Borst[12])] bestätigt wurden.

Während früher das Blut in Quantitäten von 200 bis 300 ccm angewandt wurde, hat es sich später gezeigt, daß

---

[1]) Virchows Archiv 1863.

[2]) Zit. nach v. Jürgensen in v. Ziemssens Handb. d. allgem. Ther. 1883.

[3]) Die Transfusion des Blutes, Leipzig 1875.

[4]) Virchows Archiv 57 u. 62, 1875.

[5]) Arch. f. klin. Med. 20 u. 25.

[6]) Münch. med. Wochenschr. 1892, 1894, 1895; Verhandl. d. Kongresses f. innere Med. 1892; Arch. f. klin. Med. 50, 1893.

[7]) Klin. Pathol. d. Blutes, 11. Aufl., 1908.

[8]) Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, Leipzig 1908.

[9]) Zit. n. Weber.

[10]) Münch. med. Wochenschr. 1907.

[11]) Arch. f. klin. Med. 97, 1909.

[12]) Münch. med. Wochenschr. 1910.

man durch viel geringere Mengen dieselben Resultate erzielen kann. Weber[1]) zeigte, daß bei Einführung kleiner Mengen defibrinierten Blutes derselbe Effekt zu erreichen ist wie mit großen Blutmengen, und zwar in gleicher Weise wie durch Arsenbehandlung. Es ist somit nicht möglich, die günstige Wirkung der Bluttransfusionen bei Anämie auf die Vermehrung der roten Blutkörperchen durch das zugeführte fremde Blut zurückzuführen. Die Beobachtungen sprechen dafür, daß durch die Injektion ein Reiz auf die blutbildenden Organe ausgeübt wird, und dieser Reiz kommt wohl dadurch zustande, daß die eingeführten Blutkörper zugrunde gehen.

In gutem Einklange mit dieser Auffassung steht auch die Tatsache, daß nach den Untersuchungen von Metschnikoff und Cantacuzène[2]) nach der Einführung von hämolytischem Serum eine Steigerung der Erythrocytenzahl erfolgt; da in diesem Falle kein Blut zugeführt worden ist, sondern im Gegenteil rote Blutkörperchen zerstört wurden, so kann diese Vermehrung der Blutzellen nur auf Anregung der Blutbildung beruhen.

Die Arbeiten der neuesten Zeit sprechen auch dafür, daß die Bluttransfusion vor allem durch Beeinflussung der hämopoetischen Organe wirksam ist.

Blumenthal und Morawitz[3]) fanden, daß man durch langdauernde Aderlässe bei den Versuchstieren im Knochenmark die sogenannten myeloblastischen Veränderungen hervorrufen kann. Itami[4]) wies darauf hin, daß je nach der Art der Anämie derartige Veränderungen auch in solchen Organen auftreten können, die postembryonal nicht mehr als blutbildend bezeichnet werden können: während bei toxischen Anämien myeloide Veränderungen zuerst in der Milz auftreten, fehlen sie dort bei hämorrhagischen. Aus diesen Ergebnissen zieht Itami den Schluß, daß die Blutregeneration bei toxischen Anämien intensiver vor sich geht als bei hämorrhagischen. Ritz[5]) befestigte experimentell den Gedankengang Itamis und

[1]) Siehe Fußnote 11 auf S. 160.
[2]) Annales de l'Inst. Pasteur 1900.
[3]) Arch. f. klin. Med. 92.
[4]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 60, 1908; 62, 1910.
[5]) Folia haematolog. 8, 1909.

versuchte diese Erscheinung dadurch zu erklären, daß beim Aderlaß die Blutkörperchen dem Organismus entzogen werden, während bei toxischer Anämie die Erythrocyten in der Blutbahn selbst zerfallen und dann entweder das Material zur Blutkörperchenbildung abgeben, oder als Reiz für die blutbildenden Organe dienen. Dank den Untersuchungen Itamis wissen wir auch, daß die Resorption der zerfallenen Erythrocyten nicht ohne Einfluß auf die Blutbildung bleibt. Wenn er bei Kaninchen, die durch Aderlaß anämisch gemacht waren, lackfarbenes Blut in die Bauchhöhle injizierte, konnte er eine beschleunigte Blutbildung beobachten. Die Wirkung des Serums kommt bei diesen Versuchen nicht in Betracht (Itami).

O. Huber[1]) konnte durch intramusculäre Injektionen von kleinen Mengen Menschenblut günstige Resultate bei einigen Fällen von perniciöser Anämie erzielen; auch hier ist es klar, daß die Steigerung der Blutkörperzahl bei den Kranken nicht durch die Zufuhr menschlicher Erythrocyten als solche bedingt sein kann. Alle diese Beobachtungen wiesen darauf hin, daß die Blutbildung durch chemische Substanzen der roten Blutkörperchen angeregt wird. Herr Prof. von Dungern veranlaßte mich daher zu untersuchen, ob nicht die Lipoide der Blutkörper es sind, die die Regeneration des Blutes veranlassen.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen gewählt, bei denen es verhältnismäßig leicht ist, durch geringe Aderlässe Anämie zu erzeugen. Der Aderlaß wurde aus der Ohrvene vorgenommen. Für jeden Versuch kamen 2 Kaninchen zur Verwendung, bei denen die Hämoglobinmenge nach Sahli colorimetrisch und die Zahl der Blutkörperchen in der Zeißkammer vor und nach der Anämisierung bestimmt wurde. Es wurde darauf geachtet, daß der Anämisierungsgrad bei allen Kaninchen ungefähr derselbe war. Die Dauer der Anämie und die Menge des entnommenen Blutes sind bei jeder einzelnen Tabelle angegeben. Danach wurde einem der Tiere eine Lipoidlösung injiziert, das andere diente als Kontrolle. Die erste Injektion wurde immer intravenös ausgeführt, alle folgenden subcutan. In der ganzen Periode der Regeneration wurde die Blutuntersuchung alle 2 bis 3 Tage ausgeführt, und zwar gleichzeitig bei den injizierten und bei den Kontrolltieren. Was die Lipoide anbetrifft, so wurden sie nach der von Ascoli und Izar angegebenen Methode folgendermaßen gewonnen. Zu 200 ccm mit 0,8% Kochsalzlösung auf der Zentrifuge sorgfältig gewaschenem Rinderblut wurde das dreifache Volumen Alkohol zugefügt und nach 12 bis 18stündigem Verweilen bei 37% wieder abfiltriert. Der Rückstand wurde nochmals mit

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1910, Nr. 23.

Alkohol extrahiert, und zwar so lange, bis der Alkohol farblos filtrierte. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und mit Äther 24 Stunden lang extrahiert. Der nochmals getrocknete Rest wurde schließlich für 12 bis 18 Stunden mit Alkohol in den Brutschrank gestellt und das Filtrat gewonnen. Alle alkoholischen Extrakte wurden vereinigt und auf dem Wasserbade bei 56 bis 60° zur Trockene gedampft. Dazu fügte man das ätherische Extraxt und dampfte bei 37° ein. Der ganze Rückstand wurde dann in einer genügenden Menge Methylalkohol gelöst, die Lösung für einige Zeit in den Brutschrank gestellt und filtriert; das Filtrat wurde vorsichtig auf dem Wasserbade bei 56° zur Trockene gedampft, gewogen und in 1% Methylalkohol gelöst und filtriert. Eine derartig hergestellte Stammlösung ist vollkommen klar und mehr oder weniger gelb gefärbt; nach einiger Zeit erscheint auf dem Boden des Gefäßes eine Schicht eines weißen, wolkigen Niederschlags. So hergestellt kann die Lösung lange Zeit an einem kühlen Orte aufbewahrt werden und für die einzelnen Injektionen benutzt werden.

Für intravenöse Injektionen kam 1 ccm Stammlösung zur Verwendung als Emulsion in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung (steril) 1:1000; die ganze Menge wurde unter aseptischen Kautelen in die Ohrvene injiziert. Für die subcutane Injektion wurde auf 1:500 verdünnt, also 2 ccm Stammlösung auf 10 ccm 0,8%ige Kochsalzlösung. Zur Erhaltung einer feinen durchsichtigen, leicht opalescierenden Emulsion ist es ratsam, die Lipoidlösung aus einer Pipette kräftig in die Kochsalzlösung einzublasen. Die folgenden Tabellen (I bis XIII) zeigen die Ergebnisse der Versuche.

Aus den Tabellen geht hervor, daß die Injektion der Lipoidlösung die Blutbildung beeinflußt. Ausnahmslos in allen Fällen ist bei behandelten Kaninchen eine beschleunigte Regeneration zu beobachten. Die Wirkung der Lipoide ist schon am nächsten Tage nach der Einspritzung kenntlich. Während bei den Kontrolltieren nach Beendigung der Blutentnahme die Hämoglobinmenge und die Zahl der Blutkörperchen 2 Tage lang auf demselben Niveau (Tabelle III) bleibt, oder nur eine schwache Tendenz zur Erhöhung aufweist oder sogar abfällt (Tabelle I und II), steigen die Zahlen bei den behandelten Tieren in großen Sätzen. Diese Erhöhung verlangsamt sich im Laufe der nächsten Tage, dann tritt wieder eine bedeutendere Steigerung ein, so daß die Norm erreicht oder überschritten wird. Bei Kontrolltieren verläuft die Steigerung bedeutend langsamer, und meist mehr gleichmäßig. Der Unterschied im Hämoglobingehalt zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren erreicht 10 bis 25% und in einem Falle sogar 35% (Tabelle I).

Tabelle I.

	Kaninchen 1. Gew. 2970 g			Kaninchen 2. Gew. 3260 g		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2970	5,580	76	3260	4,100	84
Versuchstag: vom 1. bis 5.	Täglich aus Ohrvene je 25 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
6.	2930	3,000	45	3150	4,040	40
7.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
9.	2930	2,600	40	3140	4,720	75
10.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
13.	2930	4,220	59	3200	5,740	76

Tabelle II.

	Kaninchen 3. Gew. 2950 g			Kaninchen 4. Gew. 2190 g		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2950	6,040	77	2190	4,980	70
Versuchstag: vom 1. bis 5.	Täglich aus Ohrvene je 25 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
6.	2780	3,940	55	2220	2,540	45
7.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
9.	2480	3,020	39	2210	3,780	53
10.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
13.	2530	3,960	51	2200	4,920	72

Tabelle III.

	Kaninchen 5			Kaninchen 6		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1280	5,820	85	1280	4,280	75
Versuchstag: vom 1. bis 3.	30 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
4.	1500	3,560	50	1410	2,740	51
5.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
7.	1420	3,160	50	1400	5,140	65

Tabelle IV.

	Kaninchen 7			Kaninchen 8		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1280	6,720	88	1400	5,160	78
Versuchstag: vom 1. bis 3.	30 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
4.	1470	2,660	46	1490	3,660	47
5.				Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000		
7.	1440	3,480	58	1510	5,040	69

Tabelle V.

	Kaninchen 9			Kaninchen 10		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1280	4,280	75	1280	5,820	85
Versuchstag: vom 1. bis 5.	Täglich aus Ohrvene 20 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
6.	1360	2,040	20	1470	2,300	24
7.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000					
8.	1370	3,070	26	1450	2,720	35
11.	1440	4,540	51	1430	3,280	51
12.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
13.	1500	4,820	52	1570	3,240	48
	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
18.	1540	6,220	76	1620	3,620	61
22.	1670	5,900	79	1670	4,860	69
	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
27.	1800	6,480	90	1720	4,900	66

Tabelle VI.

	Kaninchen 11			Kaninchen 12		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1400	5,160	78	1280	6,720	88
Versuchstag: vom 1. bis 5.	Täglich aus Ohrvene 20 ccm Blut entnommen					

Tabelle VI (Fortsetzung).

	Kaninchen 11			Kaninchen 12		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %
N. d. Anämisieren						
6.	1400	1,880	20	1410	2,220	20
7.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1:1000					
8.	1390	3,200	33	1440	2,360	19
11.	1400	4,140	47	1510	3,980	43
12.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500					
13.	1270	4,620	48	1600	3,480	44
	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500					
18.	1120	5,600	74	1650	4,860	64
22.				1800	4,880	71
27.				1870	4,820	73

Tabelle VII.

	Kaninchen 13			Kaninchen 14			Kaninchen 15		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	3260	4,100	84	2190	4,980	70	2950	6,040	77
Versuchstag: vom 1. bis 7.	135 ccm Blut entnommen								
N. d. Anämisieren	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1:1000								
8.	2990	3,000	40	2030	1,500	25	2370	1,800	24
10.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500								
11.	3080	4,040	58	2070	3,980	53	2350	2,920	37
12.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500								
13.	3220	5,260	64	2160	4,460	56	2480	2,600	44
15.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500								
18.	3240	6,060	80	2170	4,760	73	2490	3,780	55
22.	3370	6,200	88	2270	5,780	80	2500	4,880	67
27.	3500	6,640	92	2300	5,725	79	2550	5,300	76

Tabelle VIII.

	Kaninchen 16			Kaninchen 17		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i.Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2760	4,880	76	2970	5,580	76
Versuchstag: vom 1. bis 7.	135 ccm Blut entnommen					

Tabelle VIII (Fortsetzung).

	Kaninchen 16			Kaninchen 17		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
N. d. Anämisieren	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000					
8.	2690	2,980	34	2850	2,840	36
10.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
11.	2780	5,000	52	2900	2,920	40
12.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
13.	2860	4,420	54	2960	2,760	44
15.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
18.	2860	5,440	75	2820	4,420	63
22.	3020	5,960	80	2920	4,600	69
27.	3083	6,540	90	3050	4,740	69

Tabelle IX.

	Kaninchen 18			Kaninchen 19		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1390	5,760	85	1580	6,360	80
Versuchstag: vom 1. bis 7.	130 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
8.	1380	2,480	33	1290	2,500	28
9.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravenös 1 : 1000					
10.	1420	3,940	45	1330	2,840	34
11.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
13.	1500	4,240	55	1450	3,240	44
15.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1 : 500					
18.	1530	5,480	70	1450	3,800	60
22.	1550	5,600	81	1600	4,400	72
27.	1750	5,640	82	1740	5,640	79

Tabelle X.

	Kaninchen 20			Kaninchen 21			Kaninchen 22		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	1480	5,360	82	1350	5,900	80	1360	5,320	84
Versuchstag: vom 1. bis 7.	130 ccm Blut entnommen								

Tabelle X (Fortsetzung).

	Kaninchen 20			Kaninchen 21			Kaninchen 22		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
N. d. Anämisieren									
8.	1460	2,740	30	1420	2,120	25	1220	2,100	28
	Injektion 10 ccm Lipoidlös. intravensös 1:1000								
10.	1560	3,700	46	1500	3,340	38	1350	2,580	34
11.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500								
13.	1650	4,180	59	1610	4,740	55	1400	3,840	44
15.	Injektion 10 ccm Lipoidlös. subcutan 1:500								
18.	1720	5,220	77	1600	5,120	73	1450	3,920	62
22.	1850	5,760	80	1800	6,240	84	1600	4,720	72
27.	1950	5,635	80	1950	6,640	82	1700	4,746	71

Tabelle XI.

	Kaninchen 23			Kaninchen 24			Kaninchen 25		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2120	5,460	70	2000	5,020	73	2920	5,800	85
Versuchstag: vom 1. bis 5.	135 ccm Blut entnommen								
N. d. Anämisieren									
6.	1710	2,800	30	1550	1,980	30	2810	2,840	32
	Injektion 10 ccm Lecithinlös. intravenös 1:1000								
8.	1720	3,120	40	1500	2,600	37	2800	3,640	57
9.		2,760	42		2,660	39		3,720	64
	Injektion 10 ccm Lecithinlös. subcutan 1:500								
11.		3,220	48		2,540	42		4,160	68
	Injektion 10 ccm Lecithinlös. subcutan 1:500								
12.		3,960	54		2,860	44		4,200	74
13.	1850	3,800	55	1700	3,040	48	2900	4,820	76
15.	1820	4,100	65	1650	3,960	56	2870	5,040	79
18.	1520	4,580	70	1640	3,800	60	2870	5,900	80
20.		5,380	77		3,980	63		5,950	81

Tabelle XII.

	Kaninchen 26			Kaninchen 27		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2150	5,880	78	2150	6,700	82
Versuchstag: vom 1. bis 5.	135 ccm Blut entnommen					

Tabelle XII (Fortsetzung).

	Kaninchen 26			Kaninchen 27		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
N. d. Anämisieren						
6.	1850	2,920	47	2010	2,920	40
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl intravenös					
8.	1800	3,940	55	1980	3,220	53
9.		3,900	58		3,720	59
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl subcutan					
11.		4440	64		4,420	69
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl subcutan					
12.	1800	4,520	67	2120	4,448	70
13.	1820	4,390	68	2150	4,380	74
15.	1890	4,520	70	2170	4,700	76
18.		5,940	79		5,570	79

Tabelle XIII.

	Kaninchen 28			Kaninchen 29		
	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %	Gewicht g	Rote Blutkörperch. i. Millionen	Hb nach Sahli in %
Vor dem Versuch	2170	5160	80	2100	5960	84
Versuchstag: vom 1. bis 5.	135 ccm Blut entnommen					
N. d. Anämisieren						
6.	1730	3,180	47	1830	3,100	49
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl intravenös					
8.	1600	2,920	47	1820	4,020	53
9.		3,460	49		4,400	61
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl subcutan					
11.		3,400	52		3,800	66
	Injektion 10 ccm 0,8%iges NaCl subcutan					
12.	1700	3,780	56	2000	3,840	66
13.	1740	3,360	60	1900	4,483	71
15.	1740	4,160	65	1990	4,780	73
18.		5,760	70		5,300	77

Der Unterschied in der Zahl der Erythrocyten beträgt bis 2 Millionen und in seltenen Fällen beinahe 3 Millionen (Tabelle VII). Es ist besonders auffällig, daß die behandelten Tiere schon im Laufe von 12 bis 15 Tagen und in einem Fall in

20 Tagen (Tabelle X) dieselben Werte wie vor der Blutentnahme erreichten, während die Kontrolltiere dazu 27 und mehr Tage gebrauchten.

In den Fällen, wo die Anämie nicht sehr stark war und der Hämoglobingehalt nicht mehr wie 25 bis 30% sank, erholten sich die behandelten Tiere im Gegensatz zu nicht behandelten bereits in 8 Tagen (Tabelle II und teilweise I). In einem Falle (Tabelle VI) mußte der Versuch abgebrochen werden, da das Tier an einer Infektion erkrankte; ich führe auch diese Tabelle an, da aus dem Fall zu ersehen ist, daß schon am 13. Tage eine beinahe vollkommene Erholung eintrat.

Wenn wir unsere Ergebnisse mit denen von Itami nach der Injektion von lackfarbenem Blut vergleichen, so sehen wir, daß der Unterschied im Blutbefunde zwischen normalen und behandelten Tieren in den Versuchen von Itami weit geringer ist, als die von uns nach Injektionen von Blutlipoiden erhaltenen Differenzen. Auch ist die Regenerationsperiode in den Versuchen von Itami eine sehr große; der Anfangswert des Hämoglobingehaltes und der Blutkörperchenzahl wurde bei behandelten und nicht behandelten Tieren trotz der längeren Dauer der Beobachtung nicht erreicht (27 Tage).

Um weiterhin die Frage zu unterscheiden, ob ein beliebiges Lipoid den Effekt hervorruft wie die nach dem beschriebenen Verfahren aus Rinderblut gewonnenen Lipoide, stellte ich Versuche mit Lecithininjektionen bei anämisierten Tieren an. Zu diesem Zwecke wurde aus 1%iger Lecithinlösung in Methylalkohol (Ovolecithinum purissimum Merck), wie angegeben, eine Emulsion bereitet. Wie aus Tabelle X hervorgeht, hatte die Injektion nicht nur keine beschleunigte Regeneration, sondern merkwürdigerweise sogar eine Hemmung derselben zur Folge. Nach einiger Zeit glich sich der Unterschied aus; die Dauer der Regenerationsperiode war die gleiche wie bei den Kontrolltieren.

In den Versuchen der Tabellen XII und XIII wurde den Kaninchen an Stelle der Blutlipoidemulsion physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die behandelten Tiere verhielten sich genau wie die Kontrolltiere, die Regeneration vollzog sich bei beiden Gruppen gleichmäßig; der ursprüngliche Gehalt an Hämoglobin und die Blutkörperchenzahl der Norm wurden gleichzeitig erreicht. Die Kochsalzinjektion war demnach vollkommen wirkungslos.

Alle Versuchsergebnisse zeigten somit die bemerkenswerte Tatsache, daß die Injektion von Rinderblutlipoiden die Blutbildung der Kaninchen, die durch Aderlässe anämisch gemacht worden sind, in hohem Grade beschleunigt.

Zusammenfassung.

1. Injektionen von Blutlipoiden (aus Rinderblut) bei durch Aderlaß anämisch gemachten Kaninchen beeinflußten in hohem Maße die Neubildung des Blutes.

2. Die Regenerationsperiode war bei behandelten Tieren beinahe halb so groß wie bei den Kontrolltieren.

3. Lecithininjektionen (Ovolecithin. puriss. Merck) erzielten nicht den gleichen Effekt.

Die Wirkung der Bluttransfusion kann auf die Lipoide, die beim Zerfall der eingeführten Blutkörper frei werden, zurückgeführt werden.

Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 28. November 1910.)

Mit 2 Figuren im Text.

I.

Wir haben in jüngster Zeit[1]) die Beobachtung gemacht, daß die Tiergewebe die Fähigkeit besitzen, Bernsteinsäure unter Aufnahme molekularen Sauerstoffs nach der Formel:

$$C_4H_6O_4 + O = C_4H_6O_5$$

zu Apfelsäure zu oxydieren.

Das Studium der Oxydation der Bernsteinsäure scheint uns von ganz besonderer Wichtigkeit zu sein. Wir glauben, daß eine nähere Kenntnis dieser Oxydation uns in den Stand setzen wird, einen Einblick in die dunklen und verwickelten Vorgänge der Hauptatmung der Gewebe zu gewinnen. Die Oxydation der Bernsteinsäure bietet außerdem ein besonderes Interesse, weil sie mehrere Eigentümlichkeiten aufweist, die sie von der Oxydation der anderen bisher untersuchten Substanzen unterscheiden.

Der Einfluß der Bernsteinsäure auf die Atmung überlebender Tiergewebe ist zuerst von Thunberg[2]) an den Mus-

---

[1]) Battelli und Stern, Oxydation de l'acide succinique par les tissus animaux. Soc. de Biol. 69, 301, 1910. — Dieselben, Influence de quelques facteurs sur l'oxydation de l'acide succinique par les tissus animaux. Ibid. 69, 370, 1910.

[2]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. II. Mitteil. Skand. Arch. 22, 430, 1909.

keln des Frosches mit Hilfe des Mikrorespirometers untersucht worden. Thunberg untersuchte zu gleicher Zeit den Einfluß einer großen Anzahl von organischen Säuren.[1]) Er fand, daß unter den Di- und Tricarbonsäuren die einen den Gaswechsel stark vermindern (Oxalsäure, Maleinsäure u. a.), während die anderen eine geringere hemmende Wirkung ausüben. Die Bernstein-, Fumar-, Apfel- und Citronensäure hingegen steigern mehr oder weniger die Sauerstoffaufnahme; aber während die Bernsteinsäure gleichzeitig die Kohlensäurebildung stark vermindert, bewirken die drei letzteren Säuren eine beträchtliche Steigerung der Kohlensäurebildung. Aus diesen Beobachtungen schließt aber Thunberg keineswegs auf eine Oxydation der Bernsteinsäure oder der anderen Säuren, die eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme bewirken. Auf dem letzten Physiologenkongresse in Wien sprach Thunberg im Laufe einer Diskussion die Vermutung aus, daß das Pnein aus einem Gemisch von mehreren Di- und Tricarbonsäuren bestehe, eventuell durch diese ersetzt werden könne, und zwar wären es vorzüglich die Apfel-, Fumar-, Bernstein- und Citronensäure.

Wir haben diese Hypothese einer experimentellen Prüfung unterworfen und haben gefunden, daß die Bernsteinsäure die Sauerstoffaufnahme der Gewebe sehr energisch steigert, während die Kohlensäurebildung je nach den Versuchsbedingungen unverändert bleibt oder vermindert wird. Die Apfel-, Fumar- und Citronensäure können unter gewissen Bedingungen, auf die wir in einer späteren Arbeit zurückkommen werden, eine Steigerung der Kohlensäurebildung und der Sauerstoffaufnahme bewirken, doch ist die letztere unvergleichlich geringer als die durch Bernsteinsäurezusatz bewirkte.

Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme, die durch Zusatz von Bernsteinsäure bewirkt wird, ist nicht einer Aktivierung der eigentlichen Atmung des Muskels zuzuschreiben, sondern einer Oxydation der Bernsteinsäure zu Apfelsäure, wie wir bereits gesagt haben.

Die Wirkung des Pneins unterscheidet sich deutlich von der der Bernsteinsäure, denn nach Zusatz von Pnein erzielt

[1]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. IV. Mitteil. Skand. Arch. 24, 23, 1910.

man zugleich mit der Steigerung der Sauerstoffaufnahme eine entsprechende Steigerung der Kohlensäurebildung.

Die Zerstörung der Bernsteinsäure im lebenden Tierorganismus ist von mehreren Forschern untersucht worden. Wir gehen auf dieselben hier nicht ein, da sie in keinem direkten Zusammenhang mit unseren Versuchen stehen. Wir beschränken uns, die Versuche von v. Longo[1]) und von Marfori[2]) zu zitieren, aus denen hervorgeht, daß nach Ingestion von Bernsteinsäure keine Spur derselben im Harn wiedergefunden wird. Diese Resultate sind bei der großen oxydierenden Fähigkeit der Gewebe gegenüber der Bernsteinsäure leicht begreiflich.

II. Methode.

a) Vorversuche.

In der Mehrzahl unserer Versuche ist die quantitative Bestimmmung der Bernsteinsäureoxydation durch die Messung der durch Hinzufügen von Bernsteinsäure bedingten Steigerung der Sauerstoffaufnahme eines gegebenen Gewebes erfolgt. Es war vor allem notwendig, experimentell zu entscheiden, ob die Bernsteinsäure selbst einen Einfluß auf die Atmung der Gewebe ausübt.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß die Bernsteinsäure keinen merklichen Einfluß auf die akzessorische Atmung ausübt. Wenn z. B. die Leber oder die Niere die Hauptatmung verloren haben und nur die akzessorische Atmung aufweisen, bewirkt der Zusatz von Bernsteinsäure eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme, die genau der zerstörten Bernsteinsäuremenge entspricht. Die Kohlensäurebildung wird hingegen durch die Bernsteinsäure nicht merklich verändert. Die Oxydation der Bernsteinsäure summiert sich hier also einfach mit den anderen Oxydationsvorgängen der akzessorischen Atmung.

Die Hauptatmung der Gewebe wird hingegen durch Zusatz von Bernsteinsäure herabgesetzt, und zwar um so energischer, je stärker die Konzentration der Bernsteinsäure ist. Fügt man zu einem bald nach dem Tode des Tieres entnommenen Muskel Bernsteinsäure, so beobachtet man eine Verminderung der Kohlensäurebildung. Die Sauerstoffaufnahme nimmt zu, aber diese Steigerung ist bedeutend geringer als die der zerstörten Bernsteinsäuremenge entsprechende. Die Oxydation der Bernsteinsäure ersetzt in dem Falle einen Teil der eigentlichen Oxy-

---

[1]) v. Longo, Über das Verhalten des Asparagins und der Bernsteinsäure im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 213, 1877.

[2]) Marfori, Sulle transformazioni di alcuni acidi della serie ossalica nell' organismo. Acidi malonico, succinico e glutarico. Ann. di Chim. e Farmac. 1896, 193.

dationen des Gewebes, die auf diese Weise vermindert sind. Hieraus ergibt sich eine Fehlerquelle bei der Berechnung der oxydierten Bernsteinsäuremenge. Dieser Fehler kann recht groß sein, wenn die Hauptatmung stark ist; bei schwächerer Atmungsenergie wird hingegen der Fehler geringer. Immerhin ist es vorzuziehen, die Hauptatmung völlig auszuschalten.

Alle Gewebe, mit Ausnahme der Muskeln, haben die Hauptatmung 5 oder 6 Stunden nach dem Tode des Tieres verloren. Wenn es sich also um ein anderes Gewebe als Muskeln handelt, genügt es, dasselbe 5 oder 6 Stunden nach dem Tode des Tieres zu verwenden, um die Hauptatmung völlig auszuschalten.

Die Muskeln behalten hingegen einen großen Teil ihrer Hauptatmung oft 24 Stunden und noch länger nach dem Tode des Tieres bei. Um hier die Hauptatmung zu vernichten, kann man den fein zerriebenen Muskel 18 Stunden lang bei Zimmertemperatur liegen lassen. Aber das beste Verfahren ist, das zerriebene Muskelgewebe mehrere Male mit Wasser zu extrahieren und jedesmal durch ein Leinwandtuch gut auszupressen. Man erhält auf diese Weise einen Rückstand, der keinen oder fast keinen Gaswechsel mehr aufweist, hingegen die Fähigkeit besitzt, Bernsteinsäure mit großer Energie zu oxydieren. Diese oxydierende Fähigkeit eines gegebenen Gewebes ist nach einem mehrmaligen Auswaschen mit Wasser größer als vorher, was auf ein Entfernen von hemmenden Substanzen, Salzen z. B., zurückgeführt werden kann.

Wir haben außerdem untersucht, ob und wie lange dieses Oxydationsvermögen in den verschiedenen Geweben erhalten bleibt, und haben gefunden, daß bei 18° diese Oxydationsfähigkeit 24 Stunden lang und länger noch intakt bleibt und sogar etwas zunimmt. Der ausgewaschene Muskelrückstand zeigt dasselbe Verhalten.

Die Bauchspeicheldrüse bildet hiervon eine Ausnahme. Das Pankreas, das einige Stunden nach dem Tode recht energisch Bernsteinsäure oxydiert, verliert bei einer Temperatur von 18° diese Oxydationsfähigkeit nach 24 Stunden oft völlig, behält hingegen größtenteils diese oxydierende Fähigkeit bei, wenn es bei einer Temperatur von 3 bis 4° aufbewahrt wird.

Wir haben natürlich auch Versuche angestellt, um zu sehen, ob die Bernsteinsäure durch die Tiergewebe bei Sauerstoffausschluß eine Umsetzung erleidet. Zu dem Zwecke haben wir unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche nach vorheriger sorgfältiger Evakuation mit Wasserstoff gefüllt. Zu der Leber- oder Muskelemulsion wird die nötige Bernsteinsäuremenge hinzugefügt und das Ganze 2 Stunden lang bei einer Temperatur von 38° energisch geschüttelt. Am Ende des Versuches findet man die hinzugesetzte Bernsteinsäuremenge nicht merklich vermindert.

b) Definitive Methode.

Zubereitung der Gewebe in frischem Zustande. Diese Zubereitung ist sehr einfach. In Anbetracht der früher mitgeteilten Be-

obachtungen wird das Gewebe erst 3 bis 4 Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen, in einer Fleischhackmaschine fein zerrieben und mit Wasser versetzt, so daß ein flüssiges Gemenge entstehe (120 ccm Wasser für je 40 g Gewebe z. B.). Der Muskel kann in derselben Weise benutzt werden, doch ist es vorteilhafter, wie wir es bereits gezeigt haben, denselben vorher mit Wasser mehrere Male auszuwaschen und den auf diese Weise erhaltenen Rückstand zu verwenden.

Zubereitung des Muskelrückstandes. Zu je 50 g fein zerriebenen Muskelgewebes fügt man 100 ccm Wasser, schüttelt5 Minuten lang kräftig durch und preßt gut durch ein Leinwandtuch. Zum Muskelrückstand fügt man von neuem 100 ccm Wasser hinzu und wiederholt dasselbe Verfahren mehrere Male. Der Muskelrückstand kann mehrere Male in der soeben beschriebenen Weise gewaschen werden, ohne auch nur im geringsten seine oxydierende Fähigkeit einzubüßen. Ein zweimaliges Auswaschen ist jedoch völlig hinreichend, um die eigentliche Atmung des Muskels aufzuheben, so daß man mit Sicherheit behaupten kann, daß der gesamte nach Bernsteinsäurezusatz aufgenommene Sauerstoff zur Oxydation der Bernsteinsäure verbraucht wird. Zum ausgewaschenen Muskelrückstande fügt man nun 150 ccm Wasser hinzu, so daß eine Gewebesuspension erzielt wird, die der bei Anwendung des ganzen Gewebes erhaltenen ähnlich ist. 50 g Muskel liefern ungefähr 35 g Muskelrückstand.

Allgemeine Methode. Die in den vorstehenden Versuchen benutzte Methode ist im Prinzip dieselbe, die wir in unseren früheren Untersuchungen über die Atmung überlebender Gewebe, die Urikooxydase usw. angewandt haben. Die Gewebesuspension wird in eine große Flasche gebracht und in einer Sauerstoffatmosphäre energisch geschüttelt. Eine Flasche dient als Kontrollprobe. In die andere Flasche fügt man die nötige Bernsteinsäuremenge in Form von bernsteinsaurem Natrium hinzu. Während der ganzen Dauer des Versuches tauchen die Flaschen in das Wasser eines Thermostaten. Am Ende des Versuches wird die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs nach den üblichen Methoden berechnet.

Ist die Sauerstoffaufnahme in dem die Bernsteinsäure enthaltenden Reaktionsgemisch größer als in der Kontrollprobe, so schließt man daraus auf eine Oxydation der Bernsteinsäure durch das gegebene Gewebe.

Um aus der Sauerstoffaufnahme die Menge der oxydierten Bernsteinsäure zu berechnen, genügt es, in Erwägung zu ziehen, daß 1 g Bernsteinsäure zu seiner Oxydation zu Apfelsäure 95 ccm O_2 verbraucht.

Beständigkeit der Versuchsbedingungen. Mehrere Faktoren üben einen bedeutenden Einfluß auf die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Gewebe aus. Alle diese Faktoren müssen konstant gehalten werden, um untereinander vergleichbare Resultate betreffs der Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe zu erzielen. Unter den in Betracht kommenden Versuchsbedingungen sind vor allem die Dauer des Schüttelns, die Temperatur des Thermostaten, der osmotische Druck, die Reaktion des Mediums, die Konzentration der Bernsteinsäure und die Sauerstoffspannung wichtig.

Die Menge der oxydierten Bernsteinsäure hängt natürlich von der Dauer des Schüttelns ab. In den Versuchen, betreffend die Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe, betrug die Dauer des Schüttelns $^1/_2$ Stunde.

Die Temperatur des Thermostaten betrug 38 bis 40°.

Wir werden später sehen, daß die Gegenwart von Salzen auf die Oxydation der Bernsteinsäure hemmend wirkt. Aus dem Grunde wurde zum Gewebe einfaches Wasser zugesetzt. Zu 100 g Gewebe fügte man 300 ccm Wasser.

Die Reaktion des Mediums muß gegen Lackmus neutral sein. Ist die Reaktion des Gemisches etwas sauer, so wird mit verdünntem Ammoniak sorgfältig neutralisiert.

Die hinzugesetzte Bernsteinsäure muß im Überschuß sein, so daß am Ende des Versuches ein Teil der Bernsteinsäure unverändert zurückbleibt. Andererseits übt die Konzentration der Bernsteinsäure einen gewissen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit aus. In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir 3 g Bernsteinsäure für je 100 g Gewebe benutzt. Selbstverständlich wurde die Bernsteinsäurelösung mit NaOH sorgfältig neutralisiert, bevor das zu untersuchende Gewebe hinzugefügt wurde.

Die Sauerstoffspannung hat ebenfalls einen bedeutenden Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit der Bernsteinsäure. In der Mehrzahl unserer Versuche waren die das Reaktionsgemisch enthaltenden Flaschen mit fast reinem Sauerstoff gefüllt. Man verfährt hierbei wie folgt: Nachdem die Gewebesuspension in die Flasche hineingebracht wurde wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe schnell evakuiert, worauf die Flasche mit einem Sauerstoffbehälter in Verbindung gebracht wird.

Isolierung der Apfelsäure. Die Apfelsäure, die das Oxydationsprodukt der Bernsteinsäure ist, wurde von uns als apfelsaures Barium isoliert. Das einfachste von uns benutzte Verfahren ist folgendes: Das fein zerriebene Muskelgewebe (von Hund oder Pferd) wird 5 oder 6 mal mit Wasser gut ausgewaschen. Der auf diese Weise erhaltene Muskelrückstand ist fast farblos. Zu 100 g dieses Muskelrückstandes fügt man 500 ccm Wasser und 3 g Bernsteinsäure in Form des Natriumsalzes hinzu. Die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche wird so lange geschüttelt, bis die Sauerstoffaufnahme völlig aufhört, was oft schon in weniger als 1 Stunde der Fall ist. Die Flasche wird hierauf in siedendes Wasser getaucht und so lange darin gehalten, bis die Temperatur des Reaktionsgemisches 90° erreicht. Man filtriert und fügt zum Filtrate eine Lösung von essigsaurem Blei so lange hinzu, bis sich kein Niederschlag mehr bildet. Man läßt den Niederschlag absetzen und zentrifugiert hierauf. Der Niederschlag wird mehrere Male mit 50%igem Alkohol in der Zentrifuge gewaschen, bis die Flüssigkeit eine nur sehr schwache saure Reaktion aufweist. Dann wird der Niederschlag mit Wasser verrührt und der Einwirkung eines Schwefelwasserstoffstromes ausgesetzt. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wird durch Verdampfen im Wasserbade entfernt. Man erhält eine schwarze Emulsion. Man fügt nach und nach eine

Barytlösung hinzu, bis ein Niederschlag von Schwefelblei entsteht. Man filtriert und läßt das Filtrat im Wasserbade auf ein geringes Volumen einengen. Das apfelsaure Barium setzt sich allmählich in Form von weißen Plättchen ab.

Die bei der Oxydation der Bernsteinsäure entstandene Apfelsäure ist optisch inaktiv.

III. Oxydationsenergie der verschiedenen Gewebe.

Mit Hilfe der soeben beschriebenen Methode haben wir die Intensität der Bernsteinsäureoxydation in den verschiedenen Geweben untersucht. Die Gewebe wurden teils aus dem Schlachthofe bezogen, teils stammten sie von durch Verbluten getöteten Laboratoriumstieren. Die Gewebe wurden 5 Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen, fein zerrieben und in der früher beschriebenen Weise behandelt. Das Muskelgewebe wurde fein zerrieben und ungefähr 18 Stunden bei einer Temperatur von 12° gelassen, bevor es zu den Versuchen benutzt wurde. Die eigentliche Atmung des Muskels wird auf diese Weise fast völlig ausgeschaltet, wie wir es bereits früher gesagt haben.

In allen hierher gehörigen Versuchen wurde das zu untersuchende Gewebe mit gewöhnlichem Wasser versetzt und, falls nötig, mit verdünntem Ammoniak sorgfältig neutralisiert. Zu 100 g frischen Gewebes fügte man 300 ccm Wasser (400 ccm Wasser zu 100 g Muskelrückstand) und 3 g Bernsteinsäure in Form von Natriumsalz hinzu.

In der Tabelle I sind die Durchschnittswerte der durch die Oxydation der Bernsteinsäure bewirkten Steigerung der Sauerstoffaufnahme zusammengestellt. Jede Zahl entspricht einem Durchschnittswerte von mindestens 5 Versuchen, d. h. die betreffenden Gewebe wurden an fünf verschiedenen Individuen ein und derselben Tiergattung untersucht. Wir lassen die Kohlensäurewerte unberücksichtigt, da die Bernsteinsäure keinen namhaften Einfluß auf die Bildung dieses Gases bei der akzessorischen Atmung ausübt.

Aus den in der Tabelle I angegebenen Zahlen läßt sich ohne weiteres die Menge der oxydierten Bernsteinsäure in Gramm berechnen. Bekanntlich verbraucht 1 g Bernsteinsäure 95 ccm O_2, um zu Apfelsäure oxydiert zu werden.

Tabelle I.

Durchschnittswerte der durch Bernsteinsäurezusatz bewirkten Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch 100 g Gewebe. Die Werte bezeichnen die Zahl der Kubikzentimeter des aufgenommenen Sauerstoffs, bei 0° und bei einem Druck von 760 mm berechnet. In allen diesen Versuchen betrug die Dauer des Schüttelns 30 Minuten. Die Temperatur des Thermostaten war 40° und die Flaschen waren mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Pferd	Rind	Hammel	Hund	Kaninchen	Taube
Muskel	140	125	135	145	60	180
Leber	150	120	140	160	140	—
Niere	125	140	—	130	—	—
Milz	45	35	45	40	—	—
Gehirn	—	—	85	75	—	—
Lunge	40	—	35	30	—	—
Pankreas	70	60	—	—	—	—
Herz	—	—	170	190	—	—

Wir haben außerdem die Muskeln, die Leber, die Niere und das Herz von zwei normalen, zufällig verstorbenen Menschen untersucht. Die hierbei gefundenen Werte sind ungefähr um ein Drittel niedriger als die für die entsprechenden Organe des Hundes angeführten.

Wie wir bereits gesagt haben, stellen die angeführten Werte Durchschnittszahlen dar. Im allgemeinen sind die individuellen Unterschiede nicht sehr groß und überschreiten kaum 30%. Immerhin gibt es auch hier Ausnahmen, und in einigen allerdings sehr seltenen Fällen beobachtet man, daß anscheinend normale Gewebe die Hälfte oder noch weniger des gewöhnlichen Oxydationsvermögens aufweisen.

Wir sehen hier vor allem, daß alle Gewebe, die daraufhin untersucht wurden, in recht hohem Grade die Fähigkeit besitzen, Bernsteinsäure zu oxydieren. Die Substanzen, deren Oxydation durch die überlebenden Tiergewebe in vitro bisher studiert worden ist, werden von nur wenigen Organen oxydiert. So besitzen zum Beispiel die Muskeln und das Gehirn der verschiedenen Tiere nicht die Fähigkeit, Harnsäure, Xanthin, Alkohol usw. zu oxydieren.

Im allgemeinen ist die Oxydation hauptsächlich in den Muskeln, der Leber und der Niere sehr aktiv. In zweiter Linie folgen das Gehirn und das Pankreas. Die Milz und die Lunge besitzen ein geringeres Oxydationsvermögen. Wie aus den in

der Tabelle angeführten Zahlen hervorgeht, weisen die verschiedenen Säugetiere keine größeren Unterschiede in der Oxydationsfähigkeit eines gegebenen Gewebes auf. Die Muskeln des Kaninchens bilden allerdings eine Ausnahme.

Die Muskeln, die Leber und die Niere oxydieren die Bernsteinsäure mit erstaunlicher Schnelligkeit. So kann z. B. 1 kg Muskel oder Leber im Laufe 1 Stunde 3 l und noch mehr Sauerstoff aufnehmen, um eine entsprechende Menge Bernsteinsäure zu oxydieren. Diese Zahl ist sehr groß, wenn man bedenkt, daß der Mensch, der Hund usw. nur 300 bis 900 ccm Sauerstoff pro 1 kg in 1 Stunde verbraucht.

Eine, wie es uns scheint, wichtige Beobachtung ist folgende. Es existiert ein ziemlich enger Parallelismus zwischen der Intensität der Hauptatmung und der Oxydation von Bernsteinsäure in einem gegebenen Gewebe. Ein typisches Beispiel dafür gibt unter anderem der Muskel des Kaninchens, dessen Hauptatmung in vitro viel geringer ist als die der Muskeln anderer Warmblüter und der zugleich ein geringes Vermögen besitzt, Bernsteinsäure zu oxydieren. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß die bei der Bernsteinsäureoxydation durch ein gegebenes Gewebe aufgenommenen Sauerstoffmengen sich den Werten nähern, die bei der Hauptatmung desselben Gewebes erzielt werden. So fanden wir z. B., daß unter günstigen Versuchsbedingungen 100 g Muskel von Pferd, Hammel u. a. oder 100 g Leber von Hund, Kaninchen u. a. im Laufe $^1/_2$ Stunde ungefähr 140 ccm Sauerstoff zu ihrer Hauptatmung verbrauchen, 100 g Muskel von Taube ungefähr 180 ccm, während 100 g Muskel von Kaninchen nur 30 bis 40 ccm Sauerstoff aufnehmen.[1])

Das Blut der verschiedenen Tiere oxydiert nicht merklich Bernsteinsäure.

IV. Versuche, die die Bernsteinsäureoxydation bewirkende Substanz darzustellen.

Wir haben mehrfach versucht, die Substanz darzustellen, die die Fähigkeit besitzt, Bernsteinsäure zu oxydieren.

Wir haben vergeblich versucht, eine wässerige Lösung dieser Substanz zu erhalten. Das fein zerriebene Muskelgewebe wurde mit mehreren

---

[1]) Battelli und Stern, Recherches sur la respiration élémentaire des tissus. Journ. de Physiol. et Pathol. génér. 1907, 1.

Volumen Wasser bei 38° 2 Stunden lang energisch geschüttelt, ohne daß der wässerige Auszug die Fähigkeit erhielt, Bernsteinsäure auch nur in geringem Maße zu oxydieren. Preßt man hierauf die Muskelmasse durch ein Leinwandtuch, so erhält man einerseits einen Auszug, der keine Spur eines oxydierenden Vermögens aufweist, und anderseits einen Rückstand, der die Fähigkeit, Bernsteinsäure zu oxydieren, unverringert besitzt.

Ebenso wenig ist es uns gelungen, die aktive Substanz durch Alkohol- oder Acetonbehandlung darzustellen. Das fein zerriebene Gewebe wurde 5 Minuten lang mit dem zweifachen Volumen Alkohol oder Aceton verrührt, durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das auf diese Weise erhaltene Gewebepulver oxydiert die Bernsteinsäure nicht.

Durch einfaches Trocknen der Gewebe, ohne jegliche vorherige Behandlung, erhält man ein Pulver, das nur ein sehr schwaches oder gar kein Oxydationsvermögen aufweist.

Das beste Präparat, das wir darstellen konnten, ist der Muskelrückstand. Wie wir bei der Beschreibung der Methode bereits gesagt haben, kann der Muskel sehr leicht wiederholt mit Wasser gewaschen werden. Man erhält auf diese Weise eine teigartige graue Masse, die bei niedriger Temperatur mehrere Tage hindurch ungeschwächt die Fähigkeit bewahrt, Bernsteinsäure zu oxydieren. Die anderen Gewebe eignen sich weniger zu dieser Präparation, da sie eine Emulsion bilden, die sich nicht gut durch ein Tuch auspressen läßt.

Diese Versuche müssen natürlich fortgesetzt werden, um wenigstens einige Kenntnisse über die Natur und die Zusammensetzung der bei der Oxydation der Bernsteinsäure wirksamen Substanz zu erlangen.

V. Einfluß der Reaktion des Mediums.

Die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Tiergewebe vollzieht sich am schnellsten bei neutraler Reaktion des Mediums oder wenn die Alkalinität desselben potentiell ist. Leicht saure Reaktion setzt die Oxydationsenergie herab, ohne sie jedoch ganz aufzuheben. Die Gegenwart von freien H- oder OH-Ionen in genügender Konzentration hemmt die Oxydation vollständig. Die Resultate werden also verschieden sein, je nachdem man das ganze Gewebe benutzt, oder das von seinen löslichen Substanzen durch längeres Ausspülen befreite Gewebe, wie z. B. den Muskelrückstand (siehe: Methode).

Bei Benutzung des ganzen Gewebes kann man eine ziemlich große Menge Alkali hinzusetzen, ohne die Oxydation merklich zu stören, weil die vorhandene Alkalinität des Mediums durch die in den Geweben enthaltenen wasserlöslichen Substanzen neutralisiert wird. Benutzt man hingegen einen ausgewaschenen Geweberückstand, den Muskelrücktand z. B., so genügt bereits eine schwache Alkalinität, um die Oxydation völlig aufzuheben. Es genügt in dem Falle, zum Rückstande den wässerigen Auszug eines Gewebes hinzuzufügen, um die Oxydation von neuem energisch zu gestalten. Der Zusatz des Gewebeauszuges hat die Bindung der

freien OH-Ionen zur Folge, wodurch die reelle Alkalinität des Mediums in eine potentielle Alkalinität verwandelt wird.

In der Tabelle II geben wir zwei typische Versuchsreihen wieder. Zu je 30 g Muskel oder 20 g Muskelrückstand fügt man 100 ccm Flüssigkeit hinzu. Bei der Berechnung der Alkali- oder Säurekonzentration wurde das Gewebe als aus einem Volumen Wasser bestehend betrachtet. Der Muskel wurde fein zerrieben und 18 Stunden lang an der Luft gelassen, um die eigentliche Atmung des Gewebes zu vernichten.

Tabelle II.

Einfluß der Reaktion des Mediums auf die Oxydation der Bernsteinsäure (ausgedrückt durch die Steigerung der Sauerstoffaufnahme). Die Dauer des Schüttelns beträgt durchweg 30 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Die Flaschen sind mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Reaktion des Mediums	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Muskel von Pferd 30 g	neutral	43
idem	NaOH 1:3000	44
idem	NaOH 1:2000	41
idem	NaOH 1:1500	35
idem	NaOH 1:1000	6
idem	NaOH 1:500	0
idem	HCl 1:5000	28
idem	HCl 1:2000	17
idem	HCl 1:1000	0
Muskelrückstand von Pferd 20 g	neutral	52
idem	NaOH 1:5000	39
idem	NaOH 1:3000	17
idem	NaOH 1:2000	3
idem	NaOH 1:1500	0
idem	HCl 1:5000	21
idem	HCl 1:3000	9
idem	HCl 1:2000	0

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Resultate sind durch andere Versuche bestätigt worden. Die Leber zeigt dasselbe Verhalten wie die Muskeln.

In bezug auf die Reaktion des Mediums verhält sich die Oxydation der Bernsteinsäure weder wie die Hauptatmung noch wie die akzessorische Atmung. In der Tat wird die Energie der Hauptatmung durch Zusatz von Alkali oder alkalisch reagierenden Salzen beträchtlich gesteigert.[1]) Andererseits wird die Sauerstoffaufnahme bei der akzessorischen Atmung selbst durch eine recht starke Alkalinität des Mediums (NaOH 1:250 z. B.) nicht merklich herabgesetzt. Allerdings muß bemerkt werden, daß die Kohlensäureproduktion minimal wird.

[1]) Battelli und Stern, Action des sels et du glucose sur l'activité respiratoire des tissus animaux isolés. Arch. internat. de Physiol. 4, 465, 1907.

VI. Einfluß der Temperatur.

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß der Temperatur auf die Intensität der Oxydation der Bernsteinsäure untersucht. Die Gewebesuspension wurde zuerst auf die gewünschte Temperatur erwärmt, nachdem die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche mit reinem Sauerstoff gefüllt worden war, darauf wurde die nötige Menge Bernsteinsäure hinzugefügt und dann erst mit dem Schütteln begonnen.

In der folgenden Tabelle ist eine typische Versuchsreihe wiedergegeben, deren Resultate durch andere, an den Muskeln und an der Leber der verschiedenen Tiere ausgeführte Versuche bestätigt sind.

Tabelle III.

Einfluß der Temperatur auf die Intensität der Oxydation der Bernsteinsäure. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten. Jede Flasche enthält 30 g Pferdeleber, 100 ccm Wasser und 1 g Bernsteinsäure.

Gewebe	Temperatur in Zentigraden	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Leber von Pferd	10	9
idem	20	25
idem	30	41
idem	40	57
idem	45	38
idem	50	26
idem	55	7
idem	60	0

Auf Grund der soeben angeführten Versuchsergebnisse haben wir folgende Kurve (s. Fig. 1, S. 184) konstruiert.

Aus dieser Kurve geht klar hervor, daß das Temperaturoptimum der Oxydation der Bernsteinsäure bei ungefähr 40° liegt.

Es muß bemerkt werden, daß dieses Temperaturoptimum dem der Hauptatmung entspricht, während es von dem Optimum der akzessorischen Atmung und der oxydierenden Fermente beträchtlich abweicht. In der Tat haben wir in unseren früheren Untersuchungen gefunden, daß das Temperaturoptimum der Hauptatmung bei ungefähr 40° liegt und daß der Gaswechsel bei 48° bedeutend vermindert ist. Das Optimum der akzessorischen Atmung sowie der Urikooxydase und der Alkoholoxydase liegt hingegen bei 55°.

Dieser verschiedene Einfluß, den die Temperatur auf die von der Gegenwart von Zellen abhängigen Oxydationen einerseits (Optimum bei 40°) und auf die durch die löslichen oxydierenden Fermente verursachten Oyxdationen (Optimum bei 55°) andererseits ausübt, ist sicher das beste Unterscheidungsmerkmal zwischen diesen beiden Arten von Oxydationsprozessen.

Das zerriebene Gewebe verliert nach Erwärmen auf 60° während 15 Minuten vollständig die Fähigkeit, Bernsteinsäure zu oxydieren.

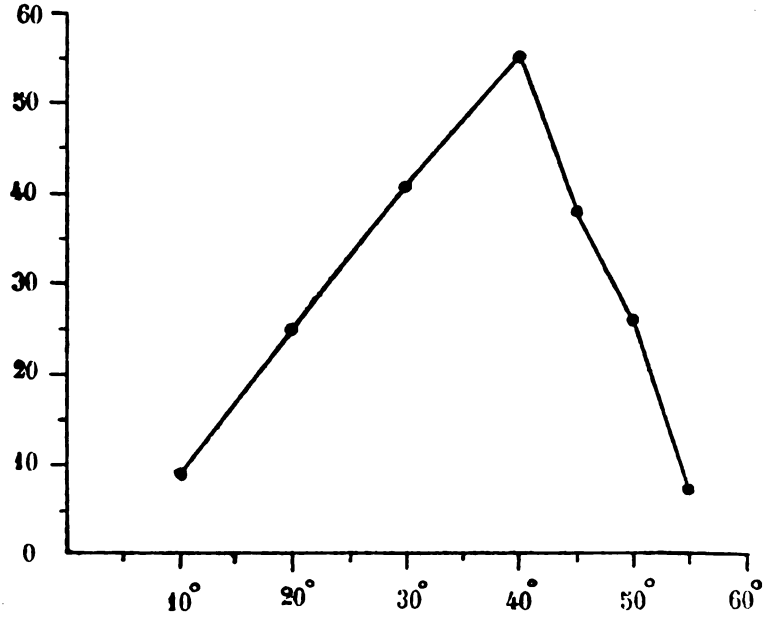


Fig. 1.

Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch Oxydation der Bernsteinsäure (Ordinaten in Kubikzentimeter) bei den verschiedenen Temperaturen (Abszisse) durch 30 g Pferdeleber in 30 Minuten.

VII. Einfluß der Bernsteinsäurekonzentration.

Die Konzentration der Bernsteinsäure übt einen gewissen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben aus. In der folgenden Tabelle stellen wir die Resultate einer typischen Versuchsreihe zusammen. In diesen Versuchen wurde natürlich stets eine genügende Menge Bernsteinsäure zugefügt, damit am Ende des Versuches ein Teil unveränderter Bernsteinsäure zurückbleibe.

Bei der Berechnung der Bernsteinsäurekonzentration wurde jedes Gramm Gewebe als gleichwertig mit 1 ccm Wasser betrachtet. So wurde in den Versuchen der Tabelle IV angenommen, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit 130 ccm betrage. Die Bernsteinsäure wurde in Form von Natriumsalz zugesetzt.

Aus den in der Tabelle IV zusammengestellten Versuchsresultaten ergibt sich deutlich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit der Bernsteinsäure bis zu einem gewissen Maximum mit steigender Konzentration zunimmt, darauf aber wieder abnimmt. In dem hier angeführten Ver-

suche ist das Optimum der Bernsteinsäurekonzentration ungefähr 1:100, aber dieses Resultat ist nicht konstant, und das Konzentrationsoptimum variiert von einem Versuche zum andern. Es ist also nicht möglich, für die Wirkung der Bernsteinsäurekonzentration eine allgemein gültige Regel aufzustellen.

Tabelle IV.

Einfluß der Bernsteinsäurekonzentration auf die Reaktionsenergie. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 30 g Gewebe und 100 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Bernsteinsäuremenge g	Bernsteinsäurekonzentration %	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Leber von Rind	0,6	0,46	51
idem	0,9	0,69	56
idem	1,20	0,92	63
idem	1,50	1,16	68
idem	2,10	1,62	55
idem	2,70	2,08	46
idem	3,30	2,54	29

Die Steigerung der Bernsteinsäurekonzentration übt auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben zwei entgegengesetzte Wirkungen aus. In dem Maße, wie die Konzentration zunimmt, nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit nach dem Massenwirkungsgesetze zu. Aber zugleich macht sich die hemmende Wirkung der Salzkonzentration, ähnlich der Wirkung anderer Salze, mehr und mehr bemerkbar. Das Endresultat hängt von der vorherrschenden Wirkung des einen oder des andern Faktors ab. In der Beziehung weichen die verschiedenen Gewebe voneinander ab.

VIII. Einfluß der Sauerstoffspannung.

Die in den vorhergehenden Kapiteln mitgeteilten Versuche sind in einer Atmosphäre reinen Sauerstoffs ausgeführt worden. Wird der Sauerstoff durch gewöhnliche Luft ersetzt, so wird die Oxydation der Bernsteinsäure beträchtlich vermindert. Im allgemeinen kann man sagen, daß die Oxydationsenergie in reinem Sauerstoff zweimal größer ist als in einer gewöhnlichen Luftatmosphäre.

In der Beziehung verhält sich die Oxydation der Bernsteinsäure ganz wie die Hauptatmung und die Oxydation der Harnsäure, die in reinem Sauerstoff ebenfalls viel energischer verlaufen als in gewöhnlicher Luft. Die akzessorische Atmung sowie die Oxydation des Alkohols durch die Alkoholoxydase weisen hingegen in gewöhnlicher Luft und in reinem Sauerstoff dieselbe Energie auf.

IX. Einfluß der Dauer des Versuches.

Die hierher gehörigen Versuche sind an der Leber und dem Muskelrückstande der verschiedenen Tiere ausgeführt worden.

Bei der großen Geschwindigkeit, mit der die Oxydation der Bernsteinsäure sich vollzieht, war es angezeigt, kleine Mengen Gewebe und große Flüssigkeitsmengen zu verwenden, um relativ große Mengen Bernsteinsäure hinzufügen zu können, ohne die Gesamtkonzentration zu stark zu erhöhen.

Wir haben in diesen Versuchen 10 g Muskelrückstand oder 15 g Leber, 200 ccm Wasser und 2,5 g Bernsteinsäure in Form von Natriumsalz verwandt.

Die Versuche wurden nicht über $2^1/_2$ Stunden ausgedehnt, um Bakterienwirkung auszuschließen.

Die Resultate eines typischen Versuches (10 g Muskelrückstand) sind durch folgende Kurve graphisch dargestellt.

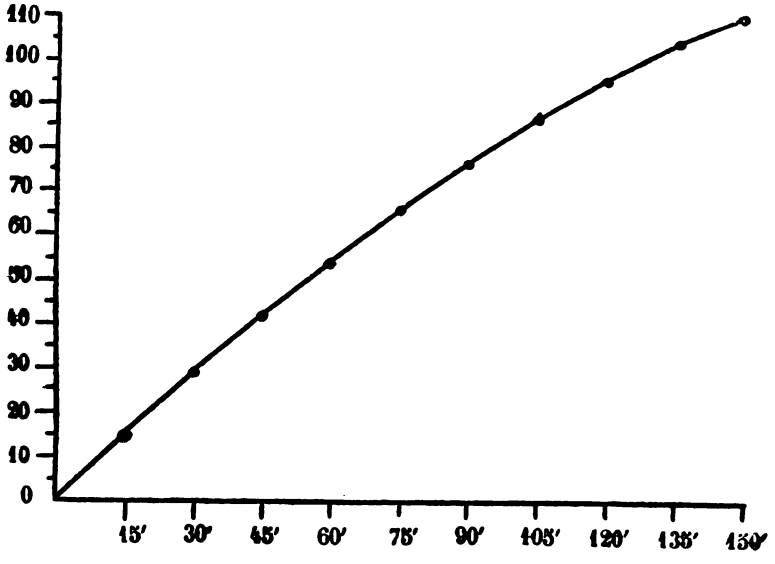


Fig. 2.

Oxydationsgeschwindigkeit der Bernsteinsäure, ausgedrückt durch die Steigerung der Sauerstoffaufnahme (Ordinaten in Kubikzentimeter) in den verschiedenen Zeiten (Abszisse in Minuten).

Diese Kurve zeigt, daß die Oxydationsintensität der Bernsteinsäure nur sehr langsam abnimmt. Nach 2 Stunden ist die Oxydationsenergie um ein Drittel des Anfangwertes vermindert.

Die Herabsetzung der Oxydationsenergie scheint auf eine Abschwächung des Oxydationsvermögens der Gewebe zurückzuführen zu

sein, denn wenn man die Flüssigkeit entfernt und durch eine frische Bernsteinsäurelösung ersetzt, so bleibt doch die Oxydation der Bernsteinsäure beträchtlich niedriger.

X. Wirkung der Phosphate, Chloride und Sulfate.

Wir haben den Einfluß der verschiedenen Salze, die in den Gewebezellen oder den Flüssigkeiten des Organismus gewöhnlich vorkommen, untersucht. Besondere Aufmerksamkeit haben wir den Kalium- und Natriumsalzen der Chlor-, Phosphor- und Schwefelsäure zugewandt. Um soweit als möglich den Einfluß der Reaktion der Phosphate auszuschalten, haben wir die Phosphorsäure mit Natriumhydrat neutralisiert, bis die Reaktion gegen Lackmus amphoter war.

In der Tabelle V geben wir einen typischen Versuch wieder.

Bei der Berechnung der Salzkonzentration wurde nur die Flüssigkeitsmenge in Betracht gezogen. Das Gewebe wurde vernachlässigt, da es eine isotonische Salzkonzentration aufweist.

Tabelle V.

Einfluß des Chlornatriums in verschiedenen Konzentrationen auf die Intensität der Bernsteinsäureoxydation. Die Dauer des Schüttelns beträgt 30 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 30 g Gewebe, 100 ccm Wasser, 1 g Bernsteinsäure und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Die Konzentration des Chlornatriums bezieht sich nur auf das hinzugefügte Wasser.

Gewebe	NaCl-Konzentration %	Steigerung der Sauerstoffaufnahme ccm
Leber von Rind	0	47
idem	0,15	46
idem	0,3	44
idem	0,5	37
idem	0,7	31
idem	0,9	25
idem	1,2	14

Die in dieser Tabelle angeführten Resultate zeigen deutlich, daß in schwacher Konzentration das Chlornatrium keinen Einfluß auf die Bernsteinsäureoxydation ausübt. In dem Maße aber, wie die Konzentration zunimmt, sinkt die Oxydationsenergie. Überraschend ist die Tatsache, daß die hemmende Wirkung dieses Salzes schon bei einer Konzentration auftritt, die niedriger als der osmotische Druck der Gewebe ist. So setzt z. B. das Chlornatrium in einer Konzentration von 0,5 : 100 die Bernsteinsäureoxydation nicht unbeträchtlich herab.

Bei gleicher molekularer Konzentration üben die Kalium- und Natriumsalze der Phosphor- und Schwefelsäure ganz dieselbe Wirkung aus wie das Chlornatrium. Man kann ohne weiteres also ein Salz durch das andere ersetzen, ohne die Resultate dadurch zu verändern.

XI. Einfluß einiger Gifte.

Wir haben hauptsächlich die Wirkung der Gifte studiert, deren Einfluß auf die eigentliche Atmung der Gewebe wir bereits in früheren Arbeiten untersucht hatten.[1])

Unter den daraufhin untersuchten Substanzen besitzt die Blausäure die weitaus stärkste Giftwirkung. Bei Benutzung des Muskelrückstandes ist die Verminderung der Bernsteinsäureoxydation schon bei einer Blausäurekonzentration von 1:200000 eine beträchtliche, und bei einer Konzentration von 1:10000 ist die Bernsteinsäureoxydation völlig aufgehoben. Bei Benutzung des frischen, nicht ausgewaschenen Muskels oder der Leber ist die Giftwirkung der Blausäure nicht so energisch, doch ist auch hier eine Konzentration von 1:3000 genügend, um die Bernsteinsäureoxydation vollständig zu verhindern. Die Wirkung der Blausäure auf die Bernsteinsäureoxydation ist zum mindesten ebenso stark wie auf die Hauptatmung.

Die arsenige Säure und der Salicylaldehyd wirken auf die Hauptatmung fast ebenso energisch wie die Blausäure, hingegen ist ihre Wirkung auf die Bernsteinsäureoxydation viel schwächer. Wie bereits gesagt wurde, müssen diese Substanzen eine ziemlich starke Konzentration (1:1000 ungefähr) erreichen, um eine deutliche Herabsetzung der Bernsteinsäureoxydation zu bewirken; bei einer Konzentration von 2:1000 ist die Bernsteinsäureoxydation manchmal fast gänzlich vernichtet. Der Acetaldehyd hat einen viel geringeren Einfluß. Die Arsensäure wirkt nur in sehr starken Konzentrationen, ebenso wie auf die Hauptatmung. Der Alkohol setzt selbst in einer Konzentration von 5:100 die Bernsteinsäureoxydation kaum merklich herab.

Das Fluornatrium in einer Konzentration von 0,5:100 bewirkt eine starke Verminderung und in einer Konzentration von 1:100 größtenteils eine völlige Vernichtung der Bernsteinsäureoxydation. Die Hauptatmung hingegen wird schon durch viel schwächere Konzentrationen von Fluornatrium beeinträchtigt.

Die Oxalsäure wirkt in gleicher Weise auf die Hauptatmung und die Bernsteinsäureoxydation. Bei einer Konzentration von 0,2:100 ist die schädigende Wirkung dieses Giftes deutlich, aber nicht sehr stark.

Die Galle setzt ebenfalls die Oxydation der Bernsteinsäure herab. Zusatz von 5 ccm Galle zu 30 g Gewebe vernichtet den größten Teil des Oxydationsvermögens des betreffenden Gewebes. Auf die Hauptatmung wirkt die Galle schon in viel geringerer Dosis; die Giftwirkung der Galle ist durch die Gallensalze bedingt.

Diese verschiedenen Gifte wirken auf die akzessorische Atmung viel weniger als auf die Hauptatmung. Die Empfindlichkeit der Bernsteinsäureoxydation gegen diese Gifte nimmt eine Mittelstellung zwischen

[1]) Battelli und Stern, Action des sels et du glucose sur l'activité respiratoire des tissus animaux isolés. Arch. internat. de Physiol. 4, 465, 1907. — Dieselben, Action de quelques substances sur l'activité respiratoire des tissus frais. Journ. de Physiol. et Pathol. géner. 1907, 410.

der Hauptatmung und der akzessorischen Atmung ein. Die Blausäure bildet eine Ausnahme, da sie, wie wir gesehen haben, die Bernsteinsäureoxydation mindestens ebenso stark beeinflußt wie die Hauptatmung.

Wir haben Untersuchungen angestellt, um zu entscheiden, ob die Giftwirkung dieser verschiedenen Substanzen eine definitive ist, oder ob nach Entfernung dieser Gifte sich die Oxydation von neuem vollziehen kann. Die hierher gehörigen Versuche sind an Muskeln gemacht worden. Die fein zerriebenen Muskeln wurden in eine wässerige Lösung der zu untersuchenden Substanz (Blausäure 1:1000, Fluornatrium 1:100, Formaldehyd und Salicylaldehyd 2:1000) gebracht und darin 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur unter häufigem Umrühren gelassen. Das Ganze wird sodann durch ein Leinwandtuch gepreßt und der Muskelrückstand wiederholt mit Wasser gewaschen. Das auf diese Weise behandelte Gewebe oxydierte unter geeigneten Versuchsbedingungen Bernsteinsäure recht energisch.

Diese verschiedenen Gifte wirken also nur durch ihre Gegenwart auf den Oxydationsvorgang der Bernsteinsäure, ohne die diese Oxydation bewirkenden Substanzen definitiv zu schädigen.

XII. Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf die Oxydation der Bernsteinsäure.

In den hierher gehörigen Versuchen ließ man das Wasserstoffsuperoxyd auf den mit Alkohol behandelten Muskel einwirken. Wie wir bereits gesehen haben, verlieren die Gewebe nach Behandlung mit Alkohol oder Aceton vollkommen die Fähigkeit, Bernsteinsäure zu oxydieren. Wir haben zu entscheiden gesucht, ob das so behandelte Gewebe durch Hinzufügen von Wasserstoffsuperoxyd das Oxydationsvermögen wiedergewinnen könnte. Wir sind auf folgende Weise vorgegangen:

Der fein zerriebene Muskel wurde mehrere Male mit Wasser ausgewaschen, um die darin enthaltene Katalase soweit wie möglich zu entfernen. Der Muskelrückstand wird mit dem 3fachen Volumen Alkohol oder Aceton versetzt, 5 Minuten lang verrührt und darauf durch ein Leinwandtuch gepreßt und im Vakuum getrocknet. Man erhält auf diese Weise ein Gewebepulver, das nur geringe Mengen Katalase enthält, so daß die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds nur unbedeutend ist.

Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu diesem Gewebepulver bewirkt keine Oxydation von Bernsteinsäure bei einer Temperatur von 40°. Der Versuch wurde 1 Stunde lang fortgesetzt, wobei die Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds stets 1:100 betrug.

Am Ende des Versuches wurde die gesamte Bernsteinsäure unverändert wiedergefunden.

XIII. Allgemeine Betrachtungen.

Mehrere Betrachtungen allgemeiner Natur sind bereits im Anfange dieser Mitteilung auseinandergesetzt worden. Wir wollen dieselben hier zusammenfassen und erläutern.

Wir schreiben der Oxydation der Bernsteinsäure eine ganz besondere Wichtigkeit zu, weil wir annehmen, daß diese Oxydation durch einen der Prozesse bedingt wird, die in der Hauptatmung mitwirken. In der Tat weist die Oxydation der Bernsteinsäure Eigentümlichkeiten auf, die sie von der akzessorischen Atmung sowie von der enzymatischen Oxydation der anderen bisher bekannten Substanzen deutlich unterscheiden, während sie andererseits einiges mit der Hauptatmung gemein hat.

Auf Grund unserer Versuche sind wir zu der Schlußfolgerung gelangt,[1]) daß der Gaswechsel der isolierten Tiergewebe durch zwei voneinander verschiedene Prozesse bewirkt wird, die wir als Hauptatmung und akzessorische Atmung bezeichnen.

Die akzessorische Atmung wird durch das Mitwirken von Substanzen bedingt, die die Eigenschaften bekannter oxydierender Fermente besitzen. So sind z. B. diese Substanzen in Wasser löslich, können durch Alkohol oder Aceton gefällt werden usw. Sie verhalten sich wie die Urikooxydase, die Alkoholoxydase usw. Es ist wahrscheinlich, daß die Zahl dieser oxydierenden Fermente mit der Zeit zunehmen wird, so daß wir auch die Substanzen besser kennen lernen werden, durch deren Oxydation der Gaswechsel der akzessorischen Atmung bewirkt wird.

Der Prozeß der Bernsteinsäureoxydation unterscheidet sich vor allem von der akzessorischen Atmung sowie von der Oxydation der Harnsäure oder des Alkohols durch die Tatsache, daß er durch keine wasserlöslichen Substanzen zustande gebracht werden kann. Unter den anderen charakteristischen Unterschieden können die folgenden hervorgehoben werden.

Die Oxydation der Bernsteinsäure wird vernichtet, wenn das Gewebe mit Alkohol oder Aceton behandelt wird, im Gegensatze zur akzessorischen Atmung. Das Temperaturoptimum der Bernsteinsäureoxydation liegt ungefähr bei 40°, während dieses Optimum für die akzessorische Atmung und die Oxydationsfermente bei 55° liegt. Endlich ist die Oxydation der Bernsteinsäure allen Geweben eigentümlich, während die

---

[1]) Battelli und Stern, Die akzessorische Atmung in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 21, 487, 1909.

akzessorische Atmung ebenso wie die bisher bekannten oxydierenden Fermente auf einige Organe beschränkt sind.

Unsere Kenntnisse betreffend den Mechanismus der Hauptatmung sind sehr beschränkt. Wir haben gefunden, daß für das Zustandekommen der Hauptatmung das Zusammenwirken zweier Substanzen oder Substanzgruppen notwendig ist, von denen die einen in Wasser löslich sind, während die anderen an den Zellen oder den Zelltrümmern haften bleiben. Die ersteren haben wir Pnein genannt und die letzteren als fundamentalen Atmungsprozeß bezeichnet. Wenn wir z. B. zu einem zerriebenen Muskel Wasser hinzufügen und darauf denselben durch ein Tuch auspressen, erhalten wir einen Rückstand (fundamentaler Atmungsprozeß) und einen Auszug (Pnein). Getrennt weist weder der Rückstand noch der Auszug Atmungstätigkeit auf, aber nach Vereinigung der beiden stellt sich die Atmung wieder ein. Der fundamentale Atmungsprozeß spielt die wichtigste Rolle im Mechanismus der Hauptatmung, das Pnein wirkt nur als Aktivator oder vielleicht als direktes Brennmaterial.

Die Oxydation der Bernsteinsäure weist nun mehrere mit der Hauptatmung eng verwandte Eigentümlichkeiten auf. Wir erinnern vor allem an die äußerst wichtige Tatsache, daß in den verschiedenen Geweben zwischen der Energie der Hauptatmung und der Intensität der Bernsteinsäureoxydation ein sehr enger Parallelismus zu verzeichnen ist. Außerdem verlangt die Bernsteinsäureoxydation ebenso wie die Hauptatmung das Mitwirken von Substanzen, die in Wasser nicht löslich sind. Unter den anderen den beiden Prozessen gemeinsamen Charakteren sind noch folgende zu nennen. Die Hauptatmung ebenso wie die Bernsteinsäureoxydation sind allen bisher untersuchten Geweben eigentümlich. Das Temperaturoptimum ist für beide 40°, und bei 55° sinken die beiden Prozesse auf ein Minimum herab. Die Behandlung des Gewebes mit Alkohol oder Aceton vernichtet vollständig die Hauptatmung und zugleich auch die Oxydation der Bernsteinsäure.

Doch gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen dem Prozeß der Hauptatmung und dem der Bernsteinsäureoxydation. Die wichtigsten darunter sind die folgenden. Die Intensität der Hauptatmung nimmt nach dem Tode allmählich

ab, und in einigen Organen, wie die Leber oder das Herz, ist diese Abnahme äußerst rapid. Außerdem zeigt sich die Hauptatmung sehr empfindlich gegen alle Einflüsse, die die Vitalität der Zelle beeinträchtigen, und es ist z. B. unmöglich, den zerriebenen Muskel 3 bis 4 mal zu waschen, ohne die Hauptatmung völlig zu vernichten. Die Energie der Bernsteinsäureoxydation hingegen bleibt in allen Geweben längere Zeit nach dem Tode unverändert, und man kann den zerriebenen Muskel unzählige Male waschen, ohne dessen Fähigkeit, Bernsteinsäure zu oxydieren, merklich zu verringern. Die Hauptatmung ist in leicht alkalischem Medium energischer als in neutralem Medium; die Bernsteinsäureoxydation vollzieht sich hingegen am energischsten in neutralem Medium. Endlich kann die Hauptatmung nicht ohne die Mitwirkung von in Wasser löslichen Substanzen (Pnein) zustande kommen, während zur Oxydation der Bernsteinsäure nur die Wirkung von in Wasser unlöslichen Substanzen genügt.

In Anbetracht der gemeinsamen Charaktere sowie der Unterschiede, die zwischen der Hauptatmung und der Bernsteinsäureoxydation verzeichnet werden können, läßt sich die Annahme machen, daß der die Oxydation der Bernsteinsäure bewirkende Prozeß einen vielleicht nicht unbeträchtlichen Teil des Mechanismus der Hauptatmung ausmacht. In der Hauptatmung kommen natürlich noch andere Prozesse in Betracht, die sich hauptsächlich durch eine große Labilität auszeichnen. Diese Hypothese kann nicht den Anspruch auf Präzision erheben, aber wir besitzen zurzeit nicht die nötigen Elemente, um unsere Hypothese genauer formulieren zu können.

Von größtem Interesse wäre es natürlich, die Natur des die Bernsteinsäure oxydierenden Prozesses zu kennen. Man könnte annehmen, daß es sich um ein besonderes oxydierendes Ferment handelt, das die Eigentümlichkeit besitzt, sehr stark an den in Wasser unlöslichen Substanzen der Gewebe zu haften. Aber eine solche Annahme stützt sich auf keine direkten experimentellen Beweise, und man kann mit ebensoviel Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es sich um Substanzen handelt, die von den gewöhnlichen oxydierenden Fermenten gänzlich verschieden sind.

XIV. Experimentelle Ergebnisse.

1. Alle Gewebe der höheren Tiere besitzen die Fähigkeit, Bernsteinsäure unter Aufnahme molekularen Sauerstoffs zu inaktiver Apfelsäure zu oxydieren.

2. In der akzessorischen Atmung summiert sich die durch diese Oxydation bewirkte Sauerstoffaufnahme mit der eigentlichen Sauerstoffaufnahme des Gewebes. In der Hauptatmung hingegen bemerkt man eine teilweise Vertretung. Der zu der gewöhnlichen eigentlichen Atmung des Gewebes bestimmte Sauerstoff wird zum Teil zur Oxydation der Bernsteinsäure verbraucht. Die Bernsteinsäure wirkt nicht wie das Pnein, da sie nur eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme bewirkt, während die Kohlensäurebildung eher vermindert wird.

3. Im allgemeinen ist die Oxydation der Bernsteinsäure namentlich im Herzen, in den Muskeln der Leber und der Niere sehr aktiv. In zweiter Reihe folgen das Gehirn und das Pankreas. Die Milz und die Lunge besitzen ein schwächeres Oxydationsvermögen. Die Muskeln des Kaninchens bilden eine Ausnahme, da sie nur ein geringes Oxydationsvermögen aufweisen. Das Blut der verschiedenen Tierarten hat keine merkliche oxydierende Wirkung auf Bernsteinsäure.

4. Die Gewebe bewahren längere Zeit nach dem Tode des Tieres das Vermögen, Bernsteinsäure zu oxydieren, unverändert. Das Pankreas allein bildet hiervon eine Ausnahme.

5. Die die Oxydation der Bernsteinsäure bewirkenden Substanzen können durch Wasser nicht extrahiert werden. Nach längerem wiederholtem Auswaschen weisen die unlöslichen Teile der Gewebe ihre Oxydationswirkung auf Bernsteinsäure unverändert auf.

6. Die mit Alkohol oder Aceton behandelten Gewebe verlieren die Fähigkeit, Bernsteinsäure zu oxydieren. Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd gibt das Oxydationsvermögen nicht zurück.

7. Die Oxydation der Bernsteinsäure ist in neutralem oder sehr schwach alkalischem Medium energischer als in schwach saurem Medium. Die Gegenwart von freien H- oder OH-Ionen in genügender Menge hebt die Oxydation der Bernsteinsäure auf.

8. Das Temperaturoptimum liegt bei ungefähr 40°. Bei 55° hört die Oxydation der Bernsteinsäure fast völlig auf. Erwärmen auf 60° während 15 Minuten vernichtet die Oxydationswirkung der Gewebe vollständig.

9. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bis zu einer gewissen Grenze mit steigender Bernsteinsäurekonzentration zu. Eine allgemeine Regel läßt sich hierfür aber nicht aufstellen.

10. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist in reinem Sauerstoff stärker als in gewöhnlicher Luft.

11. Die Intensität der Bernsteinsäureoxydation nimmt im Laufe des Versuches recht langsam ab.

12. Relativ schwache Salzkonzentrationen setzen die Intensität der Bernsteinsäureoxydation beträchtlich herab.

13. Blausäure, selbst in sehr schwacher Konzentration, vernichtet oder vermindert die Oxydation der Bernsteinsäure. Andere Substanzen, wie z. B. arsenige Säure, Oxalsäure, Natriumfluorid, Methyl- und Salicylaldehyd usw., bewirken nur in größerer Konzentration eine starke Verminderung der Bernsteinsäureoxydation. Die Giftwirkung dieser Substanzen ist keine definitive und selbst nach einem längeren Kontakt mit den wichtigsten der hier genannten Gifte erholt sich das Gewebe teilweise, sobald die Gifte durch sorgfältiges Auswaschen mit Wasser entfernt werden. Die Galle setzt ebenfalls die Oxydation der Bernsteinsäure beträchtlich herab.

14. Der die Bernsteinsäureoxydation bewirkende Prozeß unterscheidet sich deutlich von der akzessorischen Atmung und den oxydierenden Fermenten; hingegen hat er mehrere Eigentümlichkeiten mit der Hauptatmung gemein.

Beiträge zum Kalkstoffwechsel.

I. Mitteilung.

Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung kleiner Variationen im Kalkgehalte des Blutes.

Von

N. Voorhoeve.

(Mitteilungen aus dem Laboratorium der inneren Universitätsklinik in Amsterdam.)

(Eingegangen am 26. November 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

In einer Reihe von mir angestellter, aber noch nicht abgeschlossener, Untersuchungen wurde auch der Frage, ob der CaO-Gehalt des Blutes beim Menschen durch Verabreichung von CaO per os gesteigert wird, eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Zur Lösung dieses Problems war vor allem eine einwandfreie, einfache, quantitative Methode durchaus notwendig. Bis jetzt besteht eine solche aber nicht.

1. Die chemische Analyse, auch in ihren neuesten Modifikationen, ist schon deshalb praktisch ganz ungeeignet, weil man zur Analyse eine sehr große Quantität Blut, etwa 100 ccm als Minimum, braucht.

2. Die Bestimmung der Gerinnungszeit des Blutes, wie sie nach den Methoden von Vierordt[1]), Wright[2]), Russel und Brodie[3]), Sabrazès[4]), Mac Gowan[5]), Addis[6]), Guiart und Grimbert[7]),

[1]) Vierordt, Arch. f. Heilkunde 1878.

[2]) Wright, Brit. med. Journ. 2, 223, 1893.

[3]) Russel und Brodie, Journ. of Physiol. Mai 1897.

[4]) Sabrazès, Folia haematologica 1904, 394 und 1906, Nr. 7 u. 8.

[5]) Mac Gowan, Brit. med. Journ., 30. November 1907.

[6]) Addis, Brit med. Journ., 24. April 1909.

[7]) Guiart und Grimbert, Précis de diagnostic chimique. Paris 1906.

Bürker[1]), Schulz[2]) u. a. ausgeübt wird, sagt uns über die im Blute anwesende CaO-Menge nichts. Auch die Variationen in der Gerinnungszeit, selbst wenn sie nach Verabreichung von CaO per os auftreten, gestatten ohne weiteres den Schluß nicht, daß sich der Kalkgehalt des Blutes geändert hat. Manche anderen Faktoren bestimmen ebenfalls die Gerinnungszeit, und a priori ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß das Calcium, ohne in das Blut aufgenommen zu werden, einen oder mehreren Komponenten [wie z. B. die Thrombokinase, die Menge NaCl im Blute[3]) usw.], aus denen der so komplizierte Prozeß der Gerinnung sich aufbaut, beeinflußt hat.

3. Eine ebenfalls von Wright[4]) ausgearbeitete Methode schien zur quantitativen CaO-Bestimmung sehr geeignet: Minimale Quantitäten Blut, durch einen Einstich in den Finger gewonnen, werden, nachdem sie mit gleichen Quantitäten Ammonoxalat-Lösungen von steigender Konzentration gemischt sind, in ein capillares Röhrchen aufgesaugt. Ist genügend Ammonoxalat zugefügt, um alles CaO auszufällen, dann ist die Gerinnung unmöglich. Ganz unabhängig von der Zeit wird nun die kleinste Quantität Ammonoxalat bestimmt, die gerade genügt, um der Gerinnung vorzubeugen.

Wie elegant diese Methode übrigens auch sein möge, ihre Technik ist sehr schwierig, und ihr haften auch mehrere Fehler an.

Erstens sind die Quantitäten, mit denen gearbeitet wird, so verschwindend klein, daß die Genauigkeit notwendigerweise darunter leiden muß. Um so mehr ist das der Fall, als bei der quantitativen Abmessung mit dem Auge abgeschätzt wird, ob das Flüssigkeitssäulchen eine angebrachte Marke erreicht hat. Wenn man dabei in Betracht zieht, daß die Länge der Säulchen 1 bis $1^1/_2$ cm beträgt und der Durchschnitt der Röhrchen kaum 1 mm, dann ist es ohne weiteres klar, wie sich unter diesen Verhältnissen ein kleiner Fehler rächen muß!

Zweitens ist die Technik zur Anfertigung der Capillarröhrchen schwierig und zeitraubend, da dasselbe Röhrchen nur einmal verwendet werden kann.

Drittens wird das Blut durch einen Stich dem Finger entnommen. Man untersucht also ein Gemisch von Blut und Gewebsflüssigkeit. Diese Beimengung wird zwar, wenn man, wie vorschriftsmäßig, das Blut nicht aus dem Finger preßt, gering sein, über ihre Größe wissen wir aber nichts. Bekanntlich besteht nun, wie u. a. aus den vor kurzem erschienenen Arbeiten von v. d. Velden[5]) und Schulz[6]) hervorgeht, bei

---

[1]) Bürker, Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 1907.

[2]) Schulz, Berl. klin Wochenschr, 1910, Nr. 22.

[3]) Siehe die Untersuchungen von Bachrach und Fittinger, Wiener klin. Wochenschr. 1910, Nr. 11.

[4]) Wright und Knapp, Lancet, 6. Dezember 1902 und Wright und Paramore, Lancet, 14. Oktober 1905.

[5]) v. d. Velden, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, H. 1.

[6]) Schulz, l. c.

demselben Individuum, je nachdem ihm das Blut durch Einstich in die Fingerkuppe oder durch Venenpunktion entnommen wird, ein immer wieder vorzufindender Unterschied in der Gerinnungszeit. Da liegt es doch auf der Hand, anzunehmen, daß auf dem Wege von den angestochenen Gefäßchen bis zu der Hautoberfläche dem Blute etwas beigemischt wird (Thrombokinase), wie denn auch tatsächlich die allgemeine Auffassung ist.

Damit ist aber diese Weise der Blutentnahme als eine ungenaue verurteilt: nicht das Blut sensu strictiori, sondern das Blut + ein nach Qualität und Quantität unbekanntes Aliquid wird untersucht.

Außerdem hat aber diese Weise der Blutentnahme noch praktisch den Nachteil, daß man sehr schnell verfahren muß, sonst gerinnt das Blut, bevor man es aufgesaugt hat. Und dieses schnelle Verfahren kann nicht ohne Einfluß auf die Genauigkeit der schon unzuverlässigen Abschätzung der Länge der Flüssigkeitssäulchen bleiben. Durch einen Einstich sind denn auch nach dieser Methode nicht mehr wie 6 Mischungen zu machen.

Daß die hier genannten Beschwerden auch praktisch vorhanden sind, habe ich selber erfahren. Es scheint mir aber viel demonstrativer zu sein, zur Illustrierung, statt auf meine diesbezüglichen Erfahrungen, auf die Veröffentlichung von Cristea und Denk[1]) hinzuweisen. In ihren Mitteilungen über die Ursachen der Ungerinnbarkeit des Menstrualblutes teilen diese Autoren auch die Resultate ihrer nach der Wrightschen Methode ausgeübten CaO-Bestimmungen im Blute mit, und sagen, daß die Methode brauchbare Vergleichswerte ergibt. Sie fanden bei 10 nicht menstruierenden Frauen:

1× Gerinnung bei einer Mischung mit einer Amm.-oxal.-Lösung von $^1/_{1800}$
3× „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ $^1/_{1500}$
6× „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ $^1/_{1200}$

Bei 8 menstruierenden Frauen 6× bei $^1/_{1200}$, 1× bei $^1/_{900}$, 1× bei $^1/_{600}$.

Sie sagen dann, daß zwar bei einigen menstruierenden Frauen ein höherer CaO-Gehalt im Blute gefunden wurde, daß aber Unterschiede, wie zwischen der Gerinnung bei Zufügung einer Ammonoxalat-Lösung von $^1/_{1200}$ und $^1/_{600}$, innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen.

Eine einfache Berechnung[2]) lehrt nun, daß eine Ammonoxalat-Lösung von $^1/_{600}$ pro 100 ccm 65,7 mg CaO bindet, und eine solche von $^1/_{1200}$: 32,8 mg CaO.

---

[1]) Cristea und Denk, Wiener klin. Wochenschr. 1910, Nr. 7.

[2]) Mol.-Gewicht CaO = 56; Ammonoxalat = 124 (Ammon. oxal. cryst., das mit 1 Mol. H_2O krystallisiert = 142).

In einer Lösung von $^1/_{600}$ befinden sich 166,6 mg
„ „ „ „ $^1/_{1200}$ „ „ 83,3 mg
1 Mol. Amm. oxal. bindet 1 Mol. CaO
oder 142 mg „ „ binden 56 mg „

$$166{,}6 \text{ „ „ „ „ } \frac{56 \times 166{,}6}{142} = 65{,}7$$

$$83{,}3 \text{ „ „ „ „ } \frac{56 \times 83{,}3}{142} = 32{,}8$$

Wenn jemand, der sich als ein genauer Untersucher gezeigt hat, und viel mit einer Methode gearbeitet hat, erklärt, daß solche Differenzen (von nicht weniger als 100%!) innerhalb der Fehlergrenzen einer Methode liegen, dann beweist das m. E., daß entweder die Methode unzuverlässig, oder aber ihre praktische Anwendung außerordentlich schwer ist.

4. Die von Blair Bell[1]) ausgearbeitete Methode. Auch diese Methode scheint mir sehr subtil zu sein und längere Übung zu ihrer Erlernung und Beherrschung durchaus notwendig. Selber habe ich keine Erfahrung über ihre Anwendung.

Ich suchte nun nach einem genauen und technisch einfachen Verfahren, um in einer kleinen Quantität durch Venenpunktion erhaltenem Blut den CaO-Gehalt zu bestimmen, und zugleich die Gerinnungsfähigkeit des Blutes, mit vollkommener Ausschaltung der Gerinnungszeit, als Indicator für die Anwesenheit von löslichem Calcium zu benützen. Wir wissen zwar nicht genau, wie groß die Quantität Calcium sein muß, bevor sie imstande ist, CaO-freies, aber sonst gerinnungsfähiges Blut zur Gerinnung zu bringen, erstens ist aber diese Quantität sehr klein, und zweitens kam es nicht darauf an, absolute Werte zu erhalten, sondern nur kleine Unterschiede im CaO-Gehalte ausfindig zu machen.

Um der Gerinnung des Blutes bei der Venenpunktion vorzubeugen, wurde das Blut in eine mit einer Ammonoxalat-Lösung von bestimmter und genügender Stärke teilweise gefüllten Spritze aufgezogen.[2]) Vor allem kam es aber darauf an, stets genau gleich große Quantitäten Blut und Ammonoxalat miteinander zu mischen. In folgender Weise wurde das erreicht.

In einer Rekordspritze von ± 5 ccm Inhalt wird auf die Kolbenstange eine metallene Sperre in solcher Höhe angebracht, daß, wenn Flüssigkeit aufgezogen wird, bis die Sperre an die Fläche *F* stößt, gerade die Hälfte der Spritze gefüllt ist. Um die zweite Hälfte der Spritze zu füllen, wird die Stange

[1]) Blair Bell, Brit. med. Journ., 20. April 1907.

[2]) Absichtlich wurde Ammonoxalat und kein anderer gerinnungshemmender Stoff hierzu gewählt. Denn Amm. oxal. beeinflußt nur den Gehalt an löslichen CaO-Salzen, läßt aber die übrigen Gerinnungskomponenten intakt. Und später kann man durch Zufügung löslicher CaO-Salze die Wirkung des Amm. oxal. wieder qualitativ und quantitativ neutralisieren.

gedreht, bis die Sperre sich vor der Öffnung *O* befindet; die Stange wird dann weiter aufgezogen, wobei die Sperre durch die Öffnung *O* hindurch geht. Diese Vorrichtung ist der Genauigkeit sehr förderlich, denn die Abschätzung mit dem Auge, wobei Fehler von 1 mm in der Höhe nicht mit Sicherheit auszuschließen sind, fällt hierbei ganz fort. Und ein Unterschied von 1 mm in der Höhe macht bei dieser Spritze 120 cmm aus, d. h. 4,8% der halben Spritze, und da hier zwei Flüssigkeiten in gleicher Menge mit einander gemischt werden sollen, hat ein Minus von 4,8% bei der einen, ein Plus von 4,8% bei der zweiten Flüssigkeit zur Folge, der Fehler wird somit mehr wie 9%.

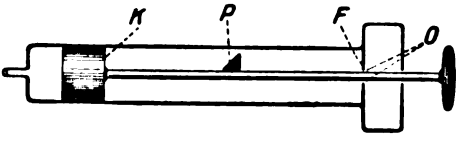


Fig. 1.

Rekordspritze, zur einen Hälfte mit einer Ammonoxalatlösung, zur anderen mit Blut zu füllen.

Ich fand nun bei Wägungen mit destilliertem Wasser, daß der Unterschied des Inhaltes der ersten Hälfte bei 20 verschiedenen Füllungen maximal 10 cmm und im Mittel 6 cmm betrug; ein größter Fehler also von 0,48%. Ebenso war der Unterschied im Inhalt zwischen erstem und zweitem Teile niemals größer als 10 cmm.

In die erste Hälfte der Spritze wird zuerst eine Lösung aufgezogen, die auf 100 ccm einer 0,9%igen, absolut CaO-freien[1]) NaCl-Lösung 229 mg Ammon. oxal. crystall. enthält. Eine solche Lösung bindet pro 100 ccm rund 90 mg CaO (die Berechnung ist dieselbe wie auf Seite 197).

Bei der Wahl der Stärke dieser Lösung mußte natürlich dem Rechnung getragen werden, daß die Quantität des Amm. oxal. viel größer sein müßte als die sich im normalen

[1]) Die gewöhnliche physiologische NaCl-Lösung ist nicht CaO-frei, denn das NaCl enthält kleine Quantitäten CaO. Fügt man einer solchen Lösung Amm. oxal. zu, dann sieht man nach einigen Minuten eine Trübung auftreten. Absolut CaO-freies NaCl ist bei Kahlbaum in Berlin zu erhalten.

Blut vorfindende CaO-Menge. In der Literatur sind die meist verschiedenen Angaben über den CaO-Gehalt des Blutes, als Ergebnis der chemischen Analyse, zu finden. Albu und Neuberg[1]), die die zuverlässigsten Angaben über pathologisches Menschenblut aus der Literatur sammelten, fanden von 2,3 bis 36 mg CaO pro 100 ccm angegeben. Wolff[2]) fand 6 bis 10 mg für Ochsenblut; Abderhalden[3]) 7,2 und Allers und Bondi[4]) 5,0 bis 7,6 mg für Kaninchenblut; Hamburger[5]), nach einer sehr genauen Methode arbeitend, fand 37 mg[6]) für Rinderblut. Wright[7]) findet nach seiner Methode beim Menschen als normal 32 bis 35 mg, wozu noch das für die Gerinnung notwendige Minimum CaO hinzugezählt werden muß, und auch noch andere Korrektionen angebracht werden müssen. Mehrere dieser Angaben sind aber aus einer Zeit, wo die chemischen Analysen der Organe und Gewebsflüssigkeiten große Differenzen aufweisen, und die Methoden nicht genügend exakt waren. Für normales Menschenblut können wir wohl annehmen, daß sein CaO-Gehalt 30 bis 40 mg pro 100 ccm nicht überschreitet.

Bei den gewöhnlichen quantitativen chemischen Analysen wird nun zu der Flüssigkeit, in der das zu bestimmende Quantum CaO sich als $CaCl_2$ in Lösung befindet, ein Übermaß von Ammonoxalat zugesetzt, und erst, nachdem die Mischung 12 bis 24 Stunden auf dem Wasserbade bei 100° gestanden hat, wird filtriert, um sicher zu sein, daß alles CaO als Oxalat ausgefallen ist.

Zuerst mußte also festgestellt werden, ob auch bei Zimmertemperatur innerhalb 24 Stunden sämtliches CaO als Oxalat niedergeschlagen wird, und ob ein Quantum Ammon. oxal., das 90 mg CaO pro 100 ccm binden kann, genügt, um 30 bis 40 mg CaO mit Sicherheit auszufällen.

Um dieses zu bestimmen, wurden folgende Versuche gemacht.

---

[1]) Albu und Neuberg, Physiol. u. Pathol. des Mineralstoffwechsels. Berlin 1906, S. 20.

[2]) Wolff, Aschenanalysen, Berlin 1871.

[3]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol Chem. 25.

[4]) Allers und Bondi, diese Zeitschr. 6, 1907.

[5]) Hamburger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59.

[6]) Es läßt sich diese Zahl leicht aus den von Hamburger mitgeteilten Tabellen berechnen.

[7]) Wright und Paramore, l. c.

Zu 100 ccm einer $CaCl_2$-Lösung, in der sich 30,24 mg CaO befanden, wurden von einer 5%igen Ammonoxalat-Lösung zirka 300 ccm hinzugefügt. Nachdem die Mischung 24 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde abfiltriert, verascht und in gewöhnlicher Weise das CaO quantitativ bestimmt. Es wurden 29,96 mg CaO gefunden.[1])

Eine gleiche Mischung gab, nachdem sie 18 Stunden auf dem Wasserbade gestanden hatte, ebenfalls 29,96 mg CaO. Da das CaO in Essigsäurelösung leichter ausgefällt werden soll, wurde zu gleichen Mischungen wie oben etwas Eisessig zugesetzt; auch hier wurden 29,96 mg CaO gefunden.

Zu 100 ccm einer gleich starken $CaCl_2$-Lösung wie oben wurden 150 ccm einer Ammonoxalat-Lösung zugefügt, die 90 resp. 60 mg CaO zu binden vermögen. Nachdem die Mischungen 24 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten, wurden in beiden Fällen 29,96 mg CaO gefunden,

Schließlich wurden zu 100 ccm derselben $CaCl_2$-Lösung 100 ccm Aq. destill. und 50 ccm einer Ammonoxalat-Lösung, die 30,13 mg CaO binden konnten, gefügt. Nach 24 Stunden Zimmertemperatur wurden hier nur 27,16 mg CaO gefunden.

Hieraus folgt also, daß die Zufügung von Ammonoxalat in einer Quantität, die 90 oder 60 mg CaO binden kann, zu einer Lösung, in der sich 30 mg CaO befinden, genügt, um nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur alles CaO auszufällen.

Mit dieser Flüssigkeit in der Spritze wird eine Venenpunktion in den Arm gemacht; die Abschnürung mit einer Gummibinde dauert dabei nur wenige Sekunden, kann sogar sehr oft ganz unterlassen werden. Die Ausführung der Venenpunktion ist meist sehr leicht; unbedingt erforderlich dabei ist, sofort in die Vene zu stechen, denn wenn die Vene zwar angestochen wird, aber die Öffnung der Nadel sich nicht in dem Gefäße befindet, gerinnt das Blut trotz der Anwesenheit des Ammonoxalat in der Spritze. Bei mehr wie 200 Punktionen, die ich ausführte, unter denen mehrere bei Patienten mit sehr dicker Fettschicht und Venen, die nicht sichtbar wurden, passierte mir dies 3mal. Wenn die Vene nicht sichtbar ist,

[1]) Doppelbestimmungen, die jedesmal angestellt werden, ergaben genau dieselben Zahlen.

kann man sie gewöhnlich palpieren, und fühlt außerdem sofort beim Aufziehen der Kolbenstange, ob die Öffnung der Nadel in der Vene steckt, denn nur dann kann man das Blut ohne Mühe aufziehen. Für die Patienten ist der Einstich in die Vene, eine scharfe Nadel natürlich vorausgesetzt, nicht unangenehmer als ein Stichlein in den Finger.

Wenn man sicher ist, daß die Nadel in der Vene steckt, wird die Kolbenstange gedreht und Blut aufgezogen, bis die Spritze gefüllt ist; dabei mischt sich das Blut sofort mit der Ammonoxalat-Lösung. Der ganze Inhalt der Spritze wird dann auf ein Uhrglas gebracht und mit einer Platinnadel tüchtig gerührt. Darauf wird Uhrglas mit Inhalt gewogen und in einen mit Wasserdampf gesättigten, luftdicht verschlossenen Raum gestellt. Ich benutze dazu einen Exsiccator, auf dessen Boden sich ein kleines mit Wasser gefülltes Gefäß befindet, und stelle das Gemisch auf eine durchlöcherte Porzellanplatte. Nach 24 Stunden wird das Uhrglas wieder gewogen.

Die Wägungen, die zur Kontrolle der eventuellen Verdampfung der Flüssigkeit dienten, ergaben eine Gewichtsabnahme von 30 bis 60 mg, d. h. von 0,6 bis 1,2%.

Nachdem das Gemisch wieder tüchtig mit einer Platinnadel gerührt ist, werden gleiche Quantitäten Oxalatblut mit gleichen Quantitäten $CaCl_2$-Lösungen in steigender Konzentration gemischt.

Zum Abmessen dieser Quantitäten habe ich mir ein Röhrchen von $\pm$ 1/2 ccm Inhalt anfertigen lassen. Es hat die gleiche Form wie die Röhrchen zur Blutkörperchen-Zählung, nur mit dem Unterschiede, daß sich in der Ampulle kein Glaskügelchen befindet. Erstens ist dies überflüssig, weil das Röhrchen nicht zur Mischung, sondern lediglich zur Abmessung dient, und zweitens hat es den Nachteil, daß beim Ausblasen immer mehr oder weniger Flüssigkeit an dem Kügelchen haftet. Nur ein Markzeichen ist angebracht, und zwar oberhalb der Ampulle. Bis hier wird zuerst Oxalatblut aufgezogen, und nachdem dies in ein Uhrglas ausgeblasen ist, wird die $CaCl_2$-Lösung aufgezogen und in dem Uhrglas mittels einer Platinnadel mit dem Oxalatblute gemischt. (Das Röhrchen kostet nur 50 Pf.)

Darauf werden die so hergestellten Mischungen in eins oder mehrere der oben beschriebenen, mit Wasserdampf gesättigten

Gefäße gebracht, und nach 20 Stunden kontrolliert, wo Gerinnung stattgefunden hat.

Erst nach 20 Stunden wurde kontrolliert, denn bisweilen waren Mischungen nach 5 Stunden nicht, einige Stunden später aber wohl geronnen. Zwar fand ich, daß 12 Stunden genügten, sicherheitshalber wurde aber stets 20 Stunden gewartet.

Was die $CaCl_2$-Lösungen anbelangt, wurde bei der Anfertigung dieser so viel NaCl zugefügt, daß das Ganze mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung isotonisch war.[1]) Der CaO-Gehalt dieser Lösungen wurde so gewählt, daß jede $2^1/_2$ mg CaO pro 100 ccm weniger enthielt als die nächstfolgende. Es konnten somit Unterschiede im CaO-Gehalte des Blutes bis auf $2^1/_2$ mg pro 100 ccm nachgewiesen werden.

Beispiel. Quantität CaO in 100 ccm Blut sei x. Gleiche Mengen Blut und Ammonoxalat-Lösung, die 90 mg CaO pro 100 ccm bindet, werden gemischt. Die Mischung enthält also $x - 90$ mg CaO pro 200 ccm.

Es trete Gerinnung auf bei Mischung gleicher Teile Oxalatblut mit einer $CaCl_2$-Lösung, die 60 mg CaO pro 200 ccm enthält, wir haben dann $x - 90 + 60 > 0$ oder $x > 30$. Bei Mischung mit einer $CaCl_2$-Lösung von $57^1/_2$ mg CaO pro 200 ccm trete keine Gerinnung auf: $x - 90 + 57^1/_2$ oder $x - 32^1/_2$ enthält also keine genügende Quantität freies CaO, um Gerinnung hervorzurufen, es ist also $32^1/_2 > x > 30$.

Ich weise hier nochmals darauf hin, daß von einer absoluten Bestimmung des CaO-Gehaltes des Blutes keine Rede ist, erstens weil die Bestimmung nur bis auf $2^1/_2$ mg pro 100 ccm genau ist, aber auch schon deshalb nicht, weil wir das Minimum

---

[1]) Berechnung. Mol.-Gew. NaCl = 58,5 (2 Ionen),
„ $CaCl_2$ = 111 (3 Ionen).
2×111 mg $CaCl_2$ gibt eine isotonische Lösung mit $3 \times 58{,}5$ mg NaCl
1 „ „ „ „ „ „ „ $\frac{3 \times 58{,}5}{2 \times 111} = 0{,}79$ „
oder rund 5 mg $CaCl_2$ geben eine isotonische Lösung mit 4 mg NaCl.

Die Rezeptur z. B. einer Lösung mit 40 mg $CaCl_2$ pro 100 ccm war also

Rp. Calc. chlorat. . . . 40 mg
Natr. chlorat. puriss. 868 „
Aq. destill. . . . 100 g

Die Auflösung enthält somit (Mol.-Gew. $CaCl_2$ = 111, CaO = 56) $\frac{56}{111} \times 40$ oder rund 20 mg CaO.

CaO, das für die Gerinnung notwendig ist, nicht kennen; dazu kommt noch, daß, wenn eine Quantität CaO und Ammonoxalat in eine Flüssigkeit in einem solchen Verhältnis zusammengebracht werden, daß alles Ammonoxalat sich mit allem CaO verbinden könnte, dies, wie aus den auf S. 201 mitgeteilten Versuchen hervorgeht, nicht der Fall ist, sondern von den 30 mg CaO nur 27 gebunden werden. Schließlich wird vorausgesetzt, daß das untersuchte Blut an sich überhaupt gerinnungsfähig ist.

Es fragt sich nun, welcher Maßstab bei der Beurteilung, ob Gerinnung eingetreten ist oder nicht, angelegt werden muß. Wir haben eine Reihe Mischungen, von denen einige kompakte oder totale Gerinnung zeigen; bei anderen, wo die hinzugefügte Menge CaO geringer war, kann man die roten Blutkörperchen, die sich auf den Boden abgesetzt haben, als ein zusammenhängendes Häutchen aus der Flüssigkeit herausziehen; weiter gibt es einige, die nur einzelne, ganz kleine, nicht zusammenhängende Coagula enthalten, und schließlich diejenige, wo sich überhaupt kein Coagulum gebildet hat.

Wenn wir uns nun die Rolle des Calciums bei der Blutgerinnung vergegenwärtigen, so wissen wir, daß sie in einer Aktivierung des Profermentes zu Ferment besteht, und wenn einmal Ferment in genügender Quantität vorhanden ist, entsteht bei Anwesenheit von Fibrinogen und Thrombokinase Fibrin und Gerinnung. In unseren Uhrgläsern ist von allen Gerinnungsfaktoren nur das Quantum CaO verschieden, und somit hängt der Unterschied in der Stärke und Ausbreitung der Gerinnung nur von der anwesenden Quantität CaO ab. Aus theoretischen Gründen könnte man es nun a priori für wahrscheinlich halten, daß schon dort, wo sich kleine Gerinnsel zeigen, der Überschuß an Ammonoxalat durch CaO gebunden ist. Dies ist aber m. E. unrichtig. Bei meinen Bestimmungen fand ich diese kleinen Coagula schon bei Zufügung von 25 bis 35 mg CaO pro 200 ccm Oxalatblut; das menschliche Blut würde also mehr wie 55 bis 65 mg CaO pro 100 ccm enthalten, eine zweifellos viel zu hohe Zahl.

Diese Erscheinung läßt sich aber ungezwungen aus der Art der Methode erklären, denn es ist deutlich, daß, je mehr CaO zugefügt wird, um so größer die Gelegenheit ist, daß hier und dort ein Ca-Ion sich der präcipitierenden Wirkung des

Ammonoxalates entzieht, und an diesen Stellen kleine Quantitäten Ferment gebildet werden, ungenügend zwar, um totale Gerinnung herbeizuführen, aber doch kleine lokale Gerinnsel bildend.

Bei stärkeren $CaCl_2$-Lösungen geschieht dasselbe schon an mehreren Stellen; aber erst, wenn noch mehr CaO frei bleibt, entsteht totale Gerinnung. Dies ist der Punkt, wo von dem Ammonoxalat so viel gebunden ist, als bei Zusatz ungefähr gleichwertiger Mengen CaO nur möglich ist.

Die totale Gerinnung hat mir denn auch als Maßstab bei diesen Bestimmungen gedient. Die Beurteilung, ob die Gerinnung schon total ist, erfordert einige Übung, die man sich aber bald angeeignet hat. Zur Kontrolle bediente ich mich folgenden Verfahrens. Sofort nach der Mischung von Oxalatblut mit $CaCl_2$-Lösung wird aus einem Uhrglas eine kleine Flüssigkeitssäule in eine kleine Capillarröhre, wie sie dem Viscosimeter nach Heß beigegeben werden, aufgezogen. Wenn man zwischen den Säulchen einen kleinen Raum läßt, können in eine Röhre aus vier verschiedenen Gläsern ebenso viele Säulchen aufgezogen werden. Nachdem die Röhrchen numeriert sind, werden ihre beiden Enden in flüssiges Paraffin getaucht, so daß sie luftdicht verschlossen sind. Sie bleiben dann 20 Stunden horizontal liegen. Dann stellt man sie vertikal und sieht nach, wo die sämtlichen roten Blutkörperchen sich nicht mehr unten absetzen.

Die Röhrchen können, nachdem sie zur Auflösung des Paraffins in Xylol gestellt sind, resp. mit HCl, KOH, Aq. destill., Alkohol und Äther durch einen Saugapparat, der mit der Wasserleitung in Verbindung steht, ausgesaugt werden, und sind dann, nachdem man, um sie absolut trocken zu machen, noch einige Zeit Luft nachgesaugt hat, wieder gebrauchsfertig.

Es bleibt mir jetzt noch übrig, den Beweis zu erbringen, daß durch die oben beschriebene Methode auch wirklich Unterschiede im CaO-Gehalte des Blutes bis auf $2^1/_2$ mg CaO pro 100 ccm angezeigt werden.

Wir brauchen dazu zwei Blutportionen, von denen wir den Unterschied im CaO-Gehalte kennen. In folgender Weise stellte ich sie künstlich her:

In die zur Hälfte mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllte Spritze wurde Ascitesflüssigkeit einer Patientin aufgezogen und die Spritze in ein Uhrglas entleert. In gleicher Weise wird nun dasselbe Quantum dieser Ascitesflüssigkeit mit einer physiologischen Lösung, in der sich 40 mg $CaCl_2$ pro 400 ccm befanden, gemischt.

Einem anderen Patienten wurde darauf sofort nacheinander aus der linken und aus der rechten Armvene je eine halbe Spritze Blut entnommen, nachdem jedesmal die erste Hälfte der Spritze mit Ammonoxalat-Lösung (90 mg CaO pro 100 ccm bindend) gefüllt war.

Zu jeder der beiden Ascites-Mischungen wurde eine Spritze dieses Oxalatblutes gefügt.

Es enthielten somit diese neuen Mischungen (CaO pro 100 ccm Blut = x; CaO pro 100 ccm Ascites-Flüssigkeit = y) pro 400 ccm:

I. $y + x - 90$ mg CaO,

II. $y + 20 + x - 90$ oder $y + x - 70$ mg CaO,

ein Unterschied also von 20 mg CaO.

Die Gerinnungsbestimmungen ergaben für:

I. totale Gerinnung nach Zufügung einer $CaCl_2$-Lösung von 45 mg CaO pro 400 ccm,

II. totale Gerinnung nach Zufügung einer $CaCl_2$-Lösung von 25 mg CaO pro 400 ccm.

[Bei $42^1/_2$ für I. keine Gerinnung, bei $22^1/_2$ für II. keine Gerinnung.] Der Unterschied von 20 mg CaO wurde also wirklich zurückgefunden.

Der gleiche Versuch wurde noch bei zwei serösen Pleuraexsudaten angestellt. Auch hier wurde beide Male der wirkliche Unterschied zurückgefunden.

Ich habe absichtlich seröse Gewebsflüssigkeiten bei diesen Versuchen gewählt, denn sie enthalten zwar Fibrinogen, aber kein Proferment. Die Mischungen I und II enthielten also nur die Hälfte der Quantität Proferment, die bei den Bestimmungen am Oxalatblute vorrätig ist. Folglich ist auch bei großen Schwankungen im Profermentgehalte die Methode richtig.

In einer nächsten Mitteilung werde ich über die nach dieser Methode geprüfte Frage, ob Einverleibung von CaO per os imstande ist, den CaO-Gehalt des Blutes beim Menschen zu erhöhen, berichten.

Wachstum und Ernährung.[1])

Von

Hans Aron.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Philippine Medical School, Manila, P. I.)

(Eingegangen am 19. November 1910.)

Das „Wachstum" wird von zwei Faktoren bedingt, dem „Wachstumstrieb"[2]) und der „Nahrungszufuhr". Die „Wachstumsgeschwindigkeit" hängt von der Größe des Wachstumstriebes und der Nahrungszufuhr ab. Durch den Wachstumstrieb kann aber nur die Bildung einer beschränkten Menge von Körpersubstanzen hervorgerufen werden. Der „Wachstumsfähigkeit" ist eine obere Grenze gesetzt, über die hinaus das Wachstum auch bei größter Nahrungszufuhr nicht getrieben werden kann. In der Regel ist, bei den verschiedenen Tieren verschieden stark, der Wachstumstrieb in der Jugend am stärksten, nimmt allmählich ab und verliert sich im Alter.

Die Natur des Wachstumstriebes ist dunkel. Sie ist eine Funktion der Zellen, im besonderen der jugendlichen Zellen. Welche Faktoren diesen Zelltrieb regulieren, wissen wir nicht, vor allem nicht, warum er allmählich aufhört. Ob hier die Zeitdauer seiner Wirksamkeit, ob die erreichte Größe des Individuums den Ausschlag für das Abklingen des Wachstumstriebes gibt, ist bis jetzt nicht entschieden.

---

[1]) Eine ausführliche Mitteilung dieser Versuche wird in englischer Sprache im Philippine Journ. of Science B, Medical Sciences, erscheinen.

[2]) Ich glaube, dieser Ausdruck Rubners (Arch. f. Hygiene 66, 81) ist dem von mir (diese Zeitschr. 12, 28) früher gewählten Worte „Wachstumsfähigkeit" in diesem Sinne vorzuziehen: das Wort „Wachstumsfähigkeit" wird besser in dem Sinne von „Wachstumsmöglichkeit" gebraucht.

Wohl aber ist die Beziehung des Wachstums zur Ernährung einem experimentellen Studium zugänglich, und solche Untersuchungen sind auch möglicherweise geeignet, auf die Natur des Wachstumstriebes einiges Licht zu werfen.

Vom energetischen Standpunkte betrachtet, braucht ein wachsender Organismus Energie in zweifacher Weise: Erstens wie ein ausgewachsener Organismus zur Erhaltung seines Körperbestandes („Erhaltungsbedarf", „Erhaltungsenergie") und zweitens zur Umformung in neu zu bildende Körperbestandteile („Wachstumsbedarf", „Wachstumsenergie"). Die logische Folgerung dieser Anschauung wäre, daß Wachstum nur dann stattfinden kann, wenn die Gesamt-Energiezufuhr größer ist als die Erhaltungsenergie, so daß ein als Wachstumsenergie verwendbarer Überschuß vorhanden ist. Allerdings ist das Wachstum ja nicht nur eine Frage der Energiezufuhr in Form von Calorien liefernden Nahrungsstoffen. Die Eiweißzufuhr, die Einnahme an Mineralstoffen u. a. muß auch den Erhaltungsbedarf in entsprechender Menge übersteigen. Wir wollen aber, wenigstens in den ersten Reihen von Versuchen, von dieser Frage absehen und einen dem Calorienüberschuß entsprechenden Überschuß an Eiweiß, Mineralstoffen usw. voraussetzen, resp. zur Verfügung stellen.

Eine interessante, theoretisch wie praktisch wichtige Frage drängt sich hier sofort auf: Was wird geschehen, wenn für kürzere oder längere Zeit in der Nahrung nur so viel Energie usw. zugeführt wird, wie erforderlich ist, um den Erhaltungsbedarf des wachsenden Organismus zu befriedigen, aber kein Überschuß, der als Wachstumsenergie dienen könnte. Die nächstliegende Annahme ist, daß dann kein Wachstum stattfindet, daß der Wachstumsprozeß stillsteht. Können wir nun wirklich den Wachstumstrieb durch Nahrungsbeschränkung unterdrücken? Wie lange? Und was geschieht später mit einem wachsenden Organismus, dessen Wachstum eine Zeit lang hintan gehalten worden ist?

Rubner[1]) stellte sich zu der Frage auf Grund der Erfahrungen Quetelets und von Versuchen von O. Kellner mit dem Seidenspinner folgendermaßen:

[1]) Max Rubner, Kraft und Stoff im Haushalte der Natur. Leipzig 1909, S. 116 bis 117.

„Sind die Zellen eines jungen Tieres ungenügend ernährt, so geht das Wachstum nicht weiter, auch nicht unter Sinken des Kraftwechsels (wobei ein Sinken der Temperatur ja unvermeidlich wäre), sondern das Wachstum steht still, ohne daß sich deshalb die Fähigkeit zum Wachstum für die nächste Zeit verliert." — Ferner: „Das Tier hört bei geringer Ernährung überhaupt auf zu wachsen, vollzieht aber seine sonstige biologische Entwicklungsperiode. Obschon also das Wachstum künstlich gehemmt werden kann und nicht latent bleibt, verliert sich trotzdem der Wachstumstrieb."

Eine Untersuchung von Kellogy und Bell[1]) an Seidenspinnern führte die Verfasser zu dem Resultat, daß unter dem Einfluß mangelhafter Ernährung während der Entwicklungszeit an Körper, Größe und Gewicht gegen Normaltiere zurückstehende Liliputanertiere erzeugt werden. Erwähnt soll auch werden, daß Gerhartz[2]) bei einer Reihe von Untersuchungen über das Wachstum zwar auch bei stillstehendem Körpergewicht Wachstum einzelner Teile nachweist, aber doch seiner Berechnung des Erhaltungsbedarfs die Nahrungsaufnahme in Perioden konstanten Gewichts zugrunde legt.

Als meine Versuche über ein Jahr im Gange und ein Teil ihrer Resultate schon mitgeteilt waren,[3]) erhielt ich durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Geheimrat Zuntz Kenntnis von einer an schwer zugänglicher Stelle veröffentlichten Arbeit von Waters[4]), die sich mit einem ähnlichen Problem befaßt. Dieser Autor hat Kälber mit verschieden großen Rationen gefüttert und die Entwickelung resp. die Formveränderungen der Tiere untersucht. Die interessanten Resultate dieser Versuche sollen nachher im Zusammenhange diskutiert werden.

Bei dem geringen vorliegenden Tatsachenmaterial — wie Rubner sagt, „ist das Wachstumsproblem mehr als stiefmütterlich behandelt worden" — schien es mir recht interessant, in einer Reihe von Versuchen den Zusammenhang zwischen Ernährung und Wachstum, vor allem den Einfluß

---

[1]) „Science" 18, 741, 1903.

[2]) Diese Zeitschr. 12, S. 97 bis 108, und Pflügers Archiv 125, H. 1 bis 4, S. 104.

[3]) Far Eastern Association of Tropical Medicine, First Biennial Meeting, Manila, P. I., March 1910, cf. auch Berl. klin. Wochenschr. 1910.

[4]) H. F. Waters, The influence of nutrition upon the animal form. Meeting of the Society for the Promotion of Agricultural Science 35.

einer langandauernden Nahrungsbeschränkung auf junge wachsende Tiere (Hunde) eingehender zu studieren. Diese Versuche wurden schon im Januar 1909 begonnen — einige dehnen sich über mehr als $1^1/_4$ Jahr aus —, können aber trotzdem noch nicht als völlig abgeschlossen betrachtet werden. Aus dem jetzt vorliegenden Material ergibt sich aber doch schon eine Reihe von Tatsachen, die mir der Mitteilung wert erscheinen:

Über die Versuchsanordnung sei hier nur so viel gesagt, daß vergleichbare junge Hunde (meist aus einem Wurf) mit verschiedenen Mengen einer gleichen, sicher genügend Eiweiß (und mit Ausnahme von Versuch I auch Mineralstoffe) enthaltenden Nahrung (erst Reis, Milch, später Fleisch, Stärke, Salze) gefüttert wurden. Die aufgenommenen Nahrungsmengen und ihre Zusammensetzung waren genau bekannt. das Gewicht der Tiere wurde täglich resp. jeden zweiten Tag bestimmt. Die Tiere wurden in den verschiedenen Stadien gemessen und photographiert und am Schlusse analysiert. Wegen aller Einzelheiten muß ich auf die ausführliche Publikation verweisen.

Es liegen 4 Versuchsreihen an insgesamt 14 Hunden vor. Da ich anfänglich der Meinung war, daß Gewichtsstillstand gleichbedeutend mit Wachstumsstillstand sein müsse, wurde versucht, die eine Hälfte der Tiere so zu füttern, daß sie ihr Gewicht nicht oder nur wenig vermehrten, die andere Hälfte so, daß sie normal oder maximal wuchsen.

In der ersten Versuchsreihe wurden 4 junge Hunde aus einem Wurf (I, II, III, IV) so genährt, daß zwei anfänglich eine geringe Gewichtszunahme aufwiesen, zuletzt Gewichtsstillstand erreichten, die anderen beiden flott wuchsen. Der Versuch mußte nach 56 Tagen beendet werden, da die Tiere (II, III, IV) durch einen Unglücksfall von einem eingeborenen Diener getötet resp. lebensgefährlich verletzt wurden. Nur Hund I wurde noch einige Zeit am Leben gelassen.

In der zweiten Versuchsreihe wurden 2 junge Hunde aus einem anderen Wurf (V und VI) 200 Tage so gefüttert, daß der eine V normal wuchs, der andere VI sein Gewicht die ganze Zeit ziemlich konstant hielt. Nur zuletzt trat eine geringe Gewichtsabnahme ein. Das Tier ging am 203. Tage unter den Zeichen vollkommenster Inanition ein, während sich sein Gewicht zwischen 3200 am 1. Tage und 2850 am 203. Tage mit zeitweisen Steigerungen bis auf 3500 gehalten hatte.

Für die dritte Versuchsreihe dienten vier nach Alter und Gewicht, aber nicht nach Abstammung vergleichbare Tiere (VIII, IX, XII, XIV). Die Kontrolltiere (VII, IX, X, XII) waren im Anfang eingegangen. 2 Hunde (XI und XIV) wurden so gefüttert, daß sie ihr Gewicht konstant halten sollten, 2 (VIII und XII) so, daß sie mehr oder minder stark wuchsen.

Die vierte Versuchsreihe schließlich ist die bestgelungene. 4 junge Hunde aus einem Wurf (A, B, C, D) wurden erst eine Zeit lang (40 Tage) gleichmäßig gefüttert, so daß sie flott wuchsen. Als alle 4 Hunde ungefähr das gleiche Gewicht hatten, wurde 1 Tier (D) als Kontrolltier getötet und analysiert, 1 Tier (A) wurde dann 300 Tage lang so ernährt, daß es praktisch nicht an Gewicht zunahm, während ein zweites Tier (B) so reichlich als möglich aufgefüttert wurde. Tier C, das ebenfalls, aber nicht so reichlich gefüttert wurde, starb leider nach 123 Tagen. Am 350. Tage wurde begonnen, dem bis dahin auf konstantem Gewicht gehaltenen Hund A reichlichere Futtermengen zu geben, um zu sehen, ob dieses Tier jetzt zu einer Zeit, da das gleichaltrige Brudertier vollkommen ausgewachsen war, noch weiter wachstumsfähig sei, d. h. seine Gewebe noch Wachstumstrieb besäßen.

Die Versuchsprotokolle sind tabellarisch (gekürzt) am Schluß der Arbeit zusammengestellt.

Bei 6 von den 14 Versuchshunden haben wir versucht, durch Nahrungsbeschränkung das Wachstum zu unterdrücken. Alle diese Tiere (II, III, VI, XI, XIV und A) blieben im Gewicht weit gegenüber den normalen Vergleichstieren (I, IV, V, VII, XII, B resp. C) zurück.

Bei der ersten Gruppe war trotz der Nahrungsbeschränkung noch eine Gewichtszunahme zu konstatieren. Hund VI der zweiten Versuchsreihe nahm erst an Gewicht ganz wenig zu, hielt dann sein Gewicht recht konstant und verlor nur gegen Ende des Versuches an Gewicht. Hund XI der dritten Versuchsreihe verlor ebenfalls, aber nur wenig an Gewicht, XIV hielt sich fast konstant. Hund A der vierten Versuchsreihe hat sein Gewicht für recht lange Zeit nur ganz wenig vermehrt, praktisch konstant gehalten.

Im großen und ganzen können wir bei all diesen Hunden von Gewichtsstillstand sprechen. Die Zunahme resp. Abnahme

betrug pro Tag meist nur wenige Gramm. War nun dieser Gewichtsstillstand gleichbedeutend mit Wachstumsstillstand? Keineswegs! Bei allen Hunden konnte man deutlich beobachten, wie die Tiere trotz des Gewichtsstillstands wuchsen, d. h. an Höhe und Länge zunahmen. Dabei wurden die Tiere zusehends magerer, Fett und Muskeln schienen an Masse abzunehmen, die runden Formen schwanden, die Knochen traten eckig unter der Haut hervor, und schließlich schienen die Tiere nur noch aus Haut und Knochen zu bestehen. Trotzdem waren die Hunde nicht etwa schwach. Im Gegenteil, sie waren lebhaft, liefen und sprangen umher, oft mehr als ihre normalen Brudertiere, die ein zwei- oder dreimal so großes Körpergewicht zu bewältigen hatten. Dieser Zustand zunehmender Abmagerung unter ständiger Größen-, d. h. Längen- und Höhenzunahme bei Konstantbleiben des Gewichtes dauerte je nach dem Grade der Nahrungsentziehung ungefähr 3 bis 5 Monate an. Wurde jetzt, wenn das Tier völlig abgemagert war, wie bei Hund VI, die Nahrungsmenge weiter so gering belassen wie vorher, so ging das Tier unter geringem Gewichtsverlust in völliger Inanition zugrunde. Wurde aber jetzt die Nahrungsmenge etwas erhöht, wie bei Hund A, so hielt sich das Tier zwar vollkommen abgemagert, aber auf konstantem Gewicht. Und jetzt erweist sich dieser Gewichtsstillstand als identisch mit Wachstumsstillstand! Der Hund A ist noch weitere 5 Monate auf dem gleichen Gewicht gehalten worden, ohne daß sich nun in seinem Aussehen nennenswerte Änderungen konstatieren ließen.

Durch geeignete Nahrungsbeschränkung gelingt es also, wachsende Hunde beliebig lange auf konstantem Gewicht zu halten. Natürlich darf man nicht allzu junge Tiere nehmen. Während dieses Gewichtsstillstandes gehen aber gewaltige Umwandlungen im Tierkörper vor, die sich äußerlich in dem fortschreitenden Längen- und Höhenwachstum und der Abmagerung dokumentieren.

Offenbar ist trotz des Gewichtsstillstandes das Skelett weiter gewachsen und hat nicht nur an Größe, sondern auch an Masse zugenommen. Folglich müssen andere Körpergebilde (wie Haut, Fleisch, Organe usw.) an Gewicht verloren haben; denn sonst könnte ja das Gewicht des Tieres nicht das gleiche

geblieben sein. Ebenso wie die Massenverhältnisse der einzelnen Körpergebilde haben sich nun höchstwahrscheinlich auch die Mengenverhältnisse der einzelnen Körperbestandteile, wie Fett, Eiweiß usw., beträchtlich verschoben. Über die Natur und den Grad dieser Veränderungen werden uns am besten die Analysen der Tierkörper Aufschluß geben, deren wichtigste Resultate ich im folgenden tabellarisch zusammenstelle:

Versuch 1.

	II.	III.	IV.	I.
Lebendgewicht	1942 g	1747 g	2850 g	4600 g
Körper = Muskel, Skelett usw.	1206 g	1133 g	1986 g	3040 g
% des Lebendgewichtes . .	62,1	64,8	69,7	66,1

Gewicht von Haut und Organen.

	Frisch			Trocken		
	II. g[1])	III. g[1])	IV. g[1])	II. g[1])	III. g[1])	IV. g[1])
Haut	282,6	238	333	104	89	120
Gehirn	60,3	57,1	59,86	10,62	10,67	11,12
Leber	95,25	85,55	140,07	22,09	21,3	35,33
Lungen	42,26	41,2	67,25	7,56	7,36	10,79
Herz	20,2	17,83	24,39	3,73	4,04	5,41
Nieren und Milz	36,2	32,4	45,37	6,30	6,10	9,83
Summe der inneren Organe	193,91	176,98	277,08	39,68	38,83	61,46
% des Lebendgewichtes . .	10,0	10,1	9,7	2,04	2,22	2,15

Versuch 1.
Zusammensetzung des „Körpers".

	II.			III.		
	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes
Fett	30,7	2,5	1,6	21,8	1,9	1,3
Protein der Muskeln .	167,0	13,9	8,6	168,0	14,9	9,6
Protein der Knochen .	47,8	3,9	2,46	42,2	3,7	2,42
Asche der Knochen .	68,3	5,7	3,52	61,5	5,4	3,52
Rest = Wasser, Muskelasche usw. . . .	882,2	74,0	45,4	839,5	74,1	48,1

[1]) Gewicht der Haut in % des Lebendgewichtes:

	frisch	trocken
II.	13,6%	5,35%
III.	14,6%	5,09%
IV.	12,0%	4,21%

Versuch 1 (Fortsetzung.)

	IV.			I.		
	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes
Fett	107,8	5,4	3,8	309,9	10,2	6,7
Protein der Muskeln	289,0	14,5	10,2	382,5	12,6	8,0
Protein der Knochen	49,5	2,5	1,74	105,5	3,5	2,29
Asche der Knochen	64,9	3,3	2,28	96,4	3,2	2,10
Rest = Wasser, Muskelasche usw.	1474,7	74,3	51,7	2145,7	70,5	46,7

Versuch 2.

Schlachtgewicht der frischen Organe usw.	Hund V. 5885 g.		Hund VI. 2708 g.	
	Gewicht g	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Lebendgewichtes
Gehirn	52[1])	0,9	58[2])	2,0
Leber	153	2,60	97	3,62
Herz	39	0,66	17	0,61
Lungen	60	1,01	29	1,07
Milz	12	0,21	2	0,01
Nieren	35	0,60	22	0,81
Verdauungstrakt leer	387	6,58	155	6,00
Rest innerer Organe	236	—	52	—
„Körper" = Muskeln und Knochen usw.	3835	65,2	1624	60,0
Haut	662	11,2	339	12,5
Blut	346[3])	—	40[4])	—
Magen-Darminhalt aus Differenz	168	—	273	—

Gewicht einiger Skeletteile.

	Hund V.		Hund VI.	
	frisch g	trocken g	frisch g	trocken g
Femur	28,35	26,53	27,2	9,85
Tibio-fibulare	25,00	15,14	23,2	9,77
Scapula	13,55	6,68	11,4	5,05
Humerus	27,45	15,63	26,8	9,84
Radius	11,65	7,36	11,05	4,84
Ulna	10,30	6,54	10,9	4,85
3 Rippen (4, 5, 6)	10,70	5,02	8,75	3,48
Summa	127,0	72,80	119,3	47,68
% des Lebendgewichtes	2,16	1,24	4,41	1,76

[1]) Trocken 12,8 g. [2]) Trocken 11,2 g. [3]) Durch Verbluten getötet. [4]) Gestorben; nach dem Tode aus den großen Gefäßen usw. gesammeltes Blut.

Versuch 2.

Zusammensetzung des Körpers und der Organe.

	Hund V.			Hund VI.		
	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Körpers	% des Lebendgewichtes
Fett	271,5	7,1	4,6	7,7	0,5	0,3
Protein der Muskeln .	632,3	16,5	10,7	110,1	6,8	4,0
Protein der Knochen .	138,6	3,6	2,4	147,6	9,0	5,4
Asche der Knochen .	131,0	3,4	2,2	126,3	7,8	4,7
Körperrest = Wasser, Muskelasche usw. .	2661,6	69,4	45,2	1232,3	75,9	45,5
Fett in den Organen	137,7	—	2,3	5,0	—	0,2
Protein in den Organen	120,6	—	2,0	51,1	—	1,9
Gesamtmenge des Fettes	409,2	—	6,9	12,7	—	0,5
Gesamtmenge des Proteins . . .	891,5	—	15,1	308,8	—	11,3

Zusammensetzung der Knochen.

	% des frischen Knochens		% des trockenen Knochens	
	V.	VI.	V.	VI.
Wasser	42,76	60,02	—	—
Protein	22,06	18,05	38,54	45,15
Asche	20,79	20,70	36,32	51,78
Fett	12,34	0,09	21,55	0,23

Betrachten wir zuerst das Skelett! Trotz der Gewichtsdifferenz der Hunde am Ende der ersten Versuchsreihe,

IV 2850 g
gegenüber II 1940 g und III 1750 g,

ist die absolute Menge Knochenasche und Knochenprotein bei allen drei Tieren die gleiche. Die Knochen der Hunde II und III müssen also trotz des Zurückbleibens im Gewicht in dem gleichen Maße gewachsen sein wie die des normalen Kontrolltieres IV. Noch besser illustriert der zweite Versuch die Verhältnisse des Knochenwachstums. Die gleichen 9 frischen Knochen wiegen:

bei dem Normaltier V von 5885 g Lebendgewicht 127,0 g oder 2,16% des Lebendgewichtes,

bei dem gleichaltrigen konstant gehaltenen Tier VI von 2710 g Lebendgewicht 119,4 g oder 4,41% des Lebendgewichtes.

Versuch 3.

Lebendgewicht:	XI. 1100 g		VIII. 2375 g		XII. 3000 g	
	Schlachtgewicht g	% des Lebendgewichtes	Schlachtgewicht g	% des Lebendgewichtes	Schlachtgewicht g	% des Lebendgewichtes
Gehirn	49	4,5	48	2,0	57	2,9
Leber	48	—	88	—	78	—
Herz	10	—	21	—	21	—
Lungen	11	—	19	—	26	—
Milz	2	—	5	—	7	—
Nieren	24	—	27	—	24	—
Verdauungstrakt leer	102	—	159	—	223	—
Rest innerer Organe	45	—	89	—	85	—
Summe der inneren Organe	242	22,0	408	17,2	465	15,5
Körper (Muskeln, Knochen usw.)	645	58,6	1413	59,5	1946	64,8
Haut	134	12,2	309	13,0	294	9,8
Blut	66	6,0	138	5,9	197	6,6
Magen-Darminhalt aus Differenz	23	—	107	—	98	—

Versuch 3.

Fett- und Proteingehalt in Organen und Muskeln.

Lebendgewicht:	VIII. 2375 g		XII. 3000 g		XI. 1100 g	
	Gewicht g	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Lebendgewichtes	Gewicht g	% des Lebendgewichtes
Fett in den Muskeln	51,9	2,2	30,1	1,0	7,0	0,6
„ „ „ Organen	21,6	0,9	19,9	0,7	4,3	0,4
Summa	73,5	3,1	50,0	1,7	11,3	1,0
Protein in den Muskeln	155,9	6,6	229,4	7,6	54,0	4,9
„ „ „ Organen	61,0	2,6	78,6	2,6	31,9	2,9
Summa	216,9	9,2	308,0	10,2	86,1	7,8

Bei normalen Hunden ist im allgemeinen das Gewicht des Skeletts im Verhältnis zum Körpergewicht recht angenähert das gleiche. Die folgende Tabelle zeigt, daß auch das Gewicht dieser ausgewählten gleichen 9 Knochen bei normalen Hunden ganz verschiedenen Gewichts und Alters im Verhältnis zu ihrem Lebendgewicht recht angenähert das gleiche ist.

Hund	Lebend-gewicht	Gewicht der gleichen 9 Knochen	% des Lebend-gewichtes
A	1985	47,0	2,37
B	3410	81,6	2,39
C	5885	127,0	2,16

Schließen wir aus diesen 9 Knochen auf das ganze Skelett, das bei normalen Hunden 15% des Lebendgewichtes ausmacht, so ergibt sich für Hund VI:

	Lebendgewicht g	Skelett g
Beginn des Versuches	3200	480
Ende „ „	2800	818

Eine andere Berechnung lehrt, daß auf das Gewicht des Skelettes bei Hund VI am Ende des Versuches 30,7% des Lebendgewichtes = 830 g entfallen, also ein recht gut übereinstimmender Wert.

Diese Zahlen zeigen, wie gewaltig sich das Gewicht des Skelettes trotz Gewichtsstillstandes, ja sogar geringer Gewichtsabnahme des Tieres vermehrt hat.

Wie schon gesagt, müssen unter diesen Umständen andere Gewebe des Körpers an Gewicht eingebüßt haben.

Die inneren Organe sind anscheinend nicht oder nur ganz wenig betroffen. Ihr Gewicht im Verhältnis zum Lebendgewicht beträgt in allen Versuchsreihen bei den auf Gewichtskonstanz gehaltenen Tieren mindestens ebensoviel als bei den normalen Vergleichstieren. Auch das Trockengewicht der Organe, das in Versuch 1 bestimmt wurde, ist in Prozenten des Lebendgewichtes ausgedrückt bei allen drei Tieren annähernd das gleiche. Somit hatte sich also die Organmasse während des Gewichtsstillstandes konstant gehalten.

Eine Ausnahme macht nur das Gehirn!

Dieses scheint — ähnlich wie die Knochen — trotz des Gewichtsstillstandes regelmäßig zu wachsen. Denn in Versuch I wie II wiegt das Gehirn der im Gewicht konstant gebliebenen Tiere mindestens ebensoviel als das der entsprechenden Normaltiere. Allerdings ist hier der Wassergehalt bei den im Gewicht konstant gehaltenen Tieren höher, ein Punkt, der noch später besprochen werden wird. Ferner dürfen wir nicht vergessen, daß das Gehirn jüngerer Tiere im Verhältnis zum Körpergewicht schon mehr wiegt als das Gehirn älterer Tiere und daß das Gehirn nicht in dem gleichen Maße mit zunehmendem Alter wächst wie die anderen Körpergebilde.

Die Haut hat im Verhältnis zum Körpergewicht bei den auf Gewichtskonstanz gehaltenen Tieren ein etwas höheres Gewicht als bei den normalen Vergleichstieren. Das bedeutet, die Masse der Haut hat während des Gewichtsstillstandes um ein geringes zugenommen; nicht erstaunlich, wenn wir die Größenzunahme der Tiere berücksichtigen.

So bleibt schließlich nur die Muskulatur, das Fleisch, als dasjenige Gebilde des Körpers, das an Gewicht eingebüßt haben muß. Und tatsächlich ist die Reduktion an Muskelprotein ganz enorm! Aus Versuch 2 ergibt sich, daß die Muskulatur beim Normaltier V frisch 50,2% des Lebendgewichtes, bei dem konstant gehaltenen Tier VI nur 29,3% des Lebendgewichtes ausmacht, also eine Reduktion auf fast die Hälfte der Norm.

Viel deutlicher werden aber die Verluste, die das Fleisch der Tiere während des Gewichtsstillstandes erlitten hat, wenn wir nicht die Gewichte der einzelnen Körpergewebe, sondern die Mengen der chemischen Bestandteile des Körpers einer Betrachtung unterziehen.

Übereinstimmend zeigt sich, daß der Fettbestand der auf Konstanz gehaltenen Tiere weitaus am meisten gelitten hat. Am größten ist der Fettverlust der Muskulatur und der Knochen, d. h. des Knochenmarkes. Die inneren Organe haben ganz beträchtlich, aber nicht in gleichem Maße an Fett eingebüßt.

Der Verlust an Körpereiweiß der auf Konstanz gehaltenen Hunde ist viel geringer als der an Fett. Zuerst müssen wir einmal feststellen, daß das Protein in den Knochen, das Ossein, infolge des Skelettwachstums an Masse nicht nur nicht ab-

genommen, sondern sogar zugenommen hat. Die inneren Organe weisen, wie Versuch 1, 2 und 3 übereinstimmend zeigen, keinen Eiweißverlust auf. Selbst bei dem an Inanition eingegangenen Hund VI macht das Organeiweiß noch 1,9% des Lebendgewichtes aus verglichen mit 2,0% beim normalen Vergleichstier V. Diese Tatsache kann uns nicht verwunderlich erscheinen, nachdem wir gesehen haben, daß weder das Gesamtgewicht dieser Organe noch das ihrer Trockensubstanz eine nennenswerte Verminderung erlitten hat.

Beträchtlich ist dagegen die Abnahme des **Muskeleiweißes** bei den auf Konstanz gehaltenen Tieren. In Versuch 1 ist die Abnahme bei der kurzen Dauer des Versuches noch verhältnismäßig gering. In Versuch 3 ist sie schon bedeutender und ganz enorm in Versuch 2. Das konstant gehaltene Tier VI besitzt nur 4,0% seines Lebendgewichtes an Muskeleiweiß gegen 10,7% beim Normaltier, also praeter propter ein Schwund von zwei Dritteln der Gesamtmenge des Muskeleiweißes.

Bemerkenswert ist, daß nicht das gesamte eingeschmolzene Muskeleiweiß dem Körper verloren gegangen ist, sondern zum Teil als Knocheneiweiß wieder angesetzt worden ist, der Gesamteiweißbestand des Körpers hat also nicht in dem gleichen Maße gelitten, wie der des Muskeleiweißes speziell.

Wird nun die durch den Verlust von Eiweiß und Fett resp. Muskel- und Fettgewebe bedingte Reduktion im Körpergewicht völlig durch die Massen- und Gewichtszunahme des Skeletts ausgeglichen! Schon eine oberflächliche Betrachtung des Zahlenmaterials zeigt, daß das recht unwahrscheinlich ist. So beträgt bei Hund VI der Verlust an Körpereiweiß mindestens 150 g, d. h. an „Muskeln" schätzungsweise mindestens 600 g; dazu kommen noch sicher mehr als 100 g Fett. Diesen Werten stehen 320 g Gewichtszunahme des Skeletts gegenüber. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei den anderen Tieren. Da das Körpergewicht aber trotzdem bei den Tieren nicht oder nur wenig gesunken ist, müssen notwendigerweise noch andere Körperbestandteile als das Skelett an Menge und Gewicht zugenommen haben.

Von größter Bedeutung für das Körpergewicht ist der **Wasserbestand** des Körpers. Es ist ja bekannt, wie erheb-

liche Änderungen im Körpergewicht (z. B. bei Säuglingen) durch Verlust oder Retention von Wasser hervorgerufen werden können. Von diesem Gesichtspunkt aus habe ich im 2. Versuch der Bestimmung des Wassergehaltes der einzelnen Körperteile besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Wie die folgende Tabelle zeigt, sind durchweg die Gewebe des im Gewicht konstant gehaltenen Hundes VI viel wasserreicher als die des Kontrolltieres V. Das Wasser wird ja in erster Linie die Stelle des Fettes eingenommen haben, wie z. B. in den Hohlräumen der Knochen. In anderen Geweben, besonders in den Muskeln und dem Blute ist der Wasserreichtum aber so groß, die Abnahme an festen Bestandteilen, vornehmlich Eiweiß, so enorm, daß man direkt von einer Verwässerung des Körpers sprechen kann.

Versuch 2.

Trockensubstanzgehalt verschiedener Körperteile.

	Hund V	Hund VI
Blut . . .	18,84[1])	5,10[1])
Gehirn . .	24,60	19,31
Knochen .	57,24	39,98
Muskeln .	29,12	15,24

Während das Gewicht der Tiere im großen und ganzen sich nicht veränderte, wurden stetig energiereiche Körperbestandteile, wie Fett und Eiweiß, eingeschmolzen und durch energiearme oder energielose Körperbestandteile, wie Knochengewebe und Wasser, ersetzt. Tatsächlich haben also die Tiere bei Gewichtsstillstand, ja sogar bei geringer Gewichtsvermehrung wenigstens vom energetischen Standpunkt an Körpersubstanzen verloren. Wie groß dieser Verlust sein kann, zeigt folgender Vergleich: 1 g des Lebendgewichtes des Hundes VI repräsentiert 0,55 Calorien, während 1 g des Lebendgewichtes des Normaltieres V 1,42 Calorien liefern würde, eine Zahl, die mit dem Rubnerschen Werte 1,5 Calorien pro Gramm Hundekörper sehr gut übereinstimmt. Das Tier von ca. 3000 g Gewicht hat also statt 4500 Cal. nur mehr ca. 1600 Cal. in seinen Geweben auf-

[1]) Protein $= N \times 6^1/_4$.

gespeichert, ein Verlust von beinahe zwei Drittel des Bestandes.

Aus der Tatsache, daß die konstant gehaltenen Tiere während des Versuches andauernd vom Energiebestande ihres Körpers zusetzen mußten, ergibt sich der Schluß, daß die Nahrungszufuhr während der Versuche den Bedarf nicht gedeckt haben kann. Ein Blick auf die Tabellen am Schlusse der Arbeit bestätigt das. Aber trotz dieser geringen, den Erhaltungsbedarf noch nicht einmal erreichenden Nahrungszufuhr zeigt sich bei allen Versuchstieren besonders im Beginn noch eine deutliche Tendenz zur Gewichtszunahme. Versuch 1, 2 und 4 lassen keinen Zweifel darüber zu, daß ein wachsender Hund, der den seinem Körpergewicht oder richtiger seiner Oberfläche entsprechenden Erhaltungsbedarf in der Nahrung aufnimmt, sich nicht auf seinem Gewicht halten, sondern an Gewicht zunehmen wird, allerdings weniger als ein normal gefüttertes Tier. Erst wenn die Nahrungszufuhr hinter dem Bedarf nicht unbeträchtlich zurückbleibt, hält sich das Gewicht konstant. Die am Erhaltungsbedarf fehlende Energiemenge wird vom Körper geliefert, der dabei beständig von seinem Energiebestande zusetzt. Ich muß es allerdings an dieser Stelle dahingestellt lassen, ob die Deckung des Mankos zwischen tatsächlicher Energiezufuhr und normalem Erhaltungsbedarf durch die vom Körper zugesetzten Energiemengen wirklich eine vollständige ist.

Betrachten wir unsere Versuchsergebnisse jetzt noch einmal zusammenfassend von einem etwas mehr biologischen Standpunkt!

Wird die Nahrungszufuhr eines jugendlichen wachsenden Tieres auch sehr weitgehend beschränkt, so steht das Wachstum des Tieres keineswegs still: Das Skelett wächst weiter und vermehrt seine Masse. Dabei gewinnt das Tier an Höhe und Größe. Zu gleicher Zeit werden die Reservestoffe des Tierkörpers, die Fette, und auch ein großer Teil des Muskelgewebes eingeschmolzen und verbraucht, während sich die Organmasse im großen und ganzen konstant hält. Allmählich sind aber auf diese Weise

auch die letzten Kräfte des Tieres aufgebraucht, und das Tier hat nichts mehr von seinem Körperbestande zuzusetzen. Bleibt jetzt die Nahrungszufuhr so niedrig wie bisher, so geht das Tier unter völliger Inanition zugrunde. Wird aber das Nahrungsquantum wenigstens so weit erhöht, daß das Tier die zur Erhaltung notwendige Energiemenge mit der Nahrung empfängt, so hält sich das Tier konstant. Solange also noch Reservestoffe vorhanden sind, entfaltet der Wachstumstrieb seine treibende Kraft, und wir sehen, daß ein Tier trotz ständiger Unterernährung noch Teile seines Körpers (Skelett) vermehrt (erste Periode). Sind dann aber alle verfügbaren Reservestoffe aufgebraucht, dann gewinnt der Erhaltungstrieb die Oberhand über den Wachstumstrieb, und das „Wachstum" stockt (zweite Periode). Gewichtsstillstand, ja selbst geringe Gewichtszunahme während der ersten Periode bedeuten Inanition, erst in der zweiten Periode Wachstumsstillstand.

Die Versuche Waters führen zu ganz ähnlichen Anschauungen: Waters hat auch beobachtet, daß seine Kälber bei Unterernährung trotz Abmagerung an Höhe zunehmen. Er nennt das resultierende Wachstum ein unproportionales, weil die Tiere mehr an Höhe als an Breite zunahmen. Er stellt ferner ebenfalls fest, daß nach einer gewissen Zeit fortschreitender Abmagerung dann das Knochenwachstum still steht.

Unsere Versuche werfen auch etwas Licht auf jene geheimnisvolle Kraft, die wir mit dem Namen „Wachstumstrieb" belegt haben. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß von allen Körpergebilden dem Skelett der stärkste Wachstumstrieb innewohnt. Das Skelett wächst während das Tier hungert, es wächst auf Kosten anderer Körperteile des Tieres. Dem Einschmelzungsprozeß fällt neben dem Fettgewebe in erster Linie die Muskulatur zum Opfer, während die Organe ihm widerstehen, wohl weil sie lebenswichtiger sind. Aus dieser Beobachtung scheint mir der Schluß erlaubt, daß die innere treibende Kraft zum Wachsen überhaupt in dem Kerngerüst des Körpers, dem Skelett, ruht. Die Muskulatur verfügt anscheinend über gar keinen richtigen Wachstumstrieb. Sie folgt

dem wachsenden Skelett nur dann, wenn die Ernährungsverhältnisse es erlauben, vielleicht auf Grund rein mechanischer Kräfte (Zug).

Recht interessant scheint zum Schluß noch die Frage, wie sich bei den durch lange fortgesetzte Unterernährung im Wachstum zurückgehaltenen Tieren die Entwicklung und die Entwicklungsfähigkeit verhält. Mein Tiermaterial war nicht ausreichend, um ein Studium der Geschlechtsorgane der zwar im Alter der Geschlechtsreife stehenden, aber im Wachstum weit zurückgebliebenen Tiere zu gestatten. Dagegen scheint mir die Beobachtung der Stimme auf ein wirkliches Zurückbleiben der Entwicklung auf dem infantilen Stadium zu deuten. Die Unterschiede zwischen den Brudertieren der ersten, zweiten und vierten Versuchsreihe waren auffällig. Die im Gewicht zurückgebliebenen Tiere schrien kreischend wie junge Hunde, während ihre normalen Brudertiere mit tiefem Tonfall bellten. In ganz dem gleichen Sinne spricht die von Waters festgestellte Tatsache, daß seine in Gewicht und Wachstum zurückgebliebenen Tiere ein Fleisch, das für „Kalbfleisch" charakteristisch war, aufwiesen, während sie dem Alter nach schon „Rindfleisch" besitzen sollten.

Versuch 1.

Datum	Versuchstag	I.		IV.		VI.		III.	
		Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag
1909									
20. Jan.	1.	1435	124	1430	124	1419	80	1390	80
25. „	6.	1465	236	1570	236	1410	125	1310	110
30. „	11.	1710	285	1730	285	1480	130	1330	110
4. Feb.	16.	1995	(270)	2090	(260)	1575	95	1510	?
9. „	21.	—	290	2100	305	—	(?)	—	110
14. „	26.	2235	340	2290	330	1705	85	1735	110
19. „	31.	2475	370	2560	350	1840	85	1715	90
24. „	36.	2660	340	2670	350	1810	85	1720	85
1. März	41.	2800	380	2760	330	1865	80	1750	80
6. „	46.	3100	380	2950	355	1910	80	1780	80
11. „	51.	3220	380	3060	355	1830	80	1780	80
16. „	56.	3380	380	2990	355	1950	80	1800	80
21. „	61.	3560	425						
26. „	66.	3850	425						
31. „	71.	4250	425						
5. April	76.	4410	425						
10. „	81.	4420	425						

Versuch 2.

Datum	Versuchstag	V. Gewicht	V. Calorien pro Tag	VI. Gewicht	VI. Calorien pro Tag
1909					
21. Jan.		2200		2750	
1. Feb.	Vor-	2600		2800	
10. „	versuch	3100		3200	
18. „		3300		3250	
19. „	1.	3340		3260	
24. „	6.	3345		3210	
1. März	11.	3805		3220	
6. „	16.	—		3320	
11. „	21.	3820		3340	
16. „	26.	4000	50 Tage 420 Cal.	3380	50 Tage 140 Cal.
21. „	31.	4040		3410	
26. „	36.	4280		3310	
31. „	41.	4400		3310	
5. April	46.	4620		3345	
10. „	51.	4610		3495	
15. „	56.	4720		3430	
20. „	61.	4850		3520	
25. „	66.	4850		3545	
30. „	71.	5020		3560	
5. Mai	76.	5090		3540	50 Tage 150 Cal.
10. „	81.	5310	58 Tage 335 Cal.	3560	
15. „	86.	5340		3555	
20. „	91.	5300		3510	
25. „	96.	5370		3500	
30. „	101.	5380		3530	7 Tage
4. Juni	106.	5320		3500	135 Cal.
9. „	111.	5370		3590	
14. „	116.	5275	13 Tage 360 Cal.	3400	
19. „	121.	5285		3430	
24. „	126.	5260	10 Tage	3210	
29. „	131.	5220	420 Cal.	3310	
4. Juli	136.	5290		3375	
9. „	141.	5280		3330	
14. „	146.	5320		3240	
19. „	151.	5310		3150	92 Tage
24. „	156.	5445		3030	120 Cal.
29. „	161.	5610		3000	
3. Aug.	166.	5690		2870	
8. „	171.	5815	77 Tage	2880	
13. „	176.	5950	480 Cal.	2835	
18. „	181.	5805		2835	
23. „	186.	5860		2830	
28. „	191.	5780		2950	
2. Sept.	196.	5775		2830	
7. „	201.	5750		2850	3 Tage
				am 203. Tg. †	
12. „	206.	5880		2708	150 Cal.
		getötet 208. Tag, 5885 g			

Versuch 3.

Datum	Versuchstag	VII. Gewicht	VII. Calorien pro Tag	XI. Gewicht	XI. Calorien pro Tag	XII. Gewicht	XII. Calorien pro Tag	XIV. Gewicht	XIV. Calorien pro Tag
1909									
25. Feb.	1.	585	10 Tage	760		860		730	
2. März	6.	675	130 Cal.	800	20 Tage	940		775	
7. „	11.	720	8 Tage	875	110 Cal.	1150	21 Tage	780	21 Tage
			165 Cal.				225 Cal.		110 Cal.
12. „	16.	840	4 Tage	905		1275		805	
			200 Cal.						
17. „	21.	990		950		1400		865	
22. „	26.	1055	23 Tage	975	25 Tage	1480	22 Tage	915	22 Tage
27. „	31.	1125	180 Cal.	980	90 Cal.	1570	205 Cal.	915	70 Cal.
1. April	36.	1175		973		1650		935	
6. „	41.	1265		1040		1785		945	
12. „	46.	1340		1090		1845		925	
16. „	51.	1415		1035		1840		930	
21. „	56.	1500		1045		1910		945	
26. „	61.	1570	50 Tage	1120		2050	52 Tage	1000	48 Tage
1. Mai	66.	1670	190 Cal.	1185		2180	215 Cal.	1020	75 Cal.
6. „	71.	1740		1235	50 Tage	2345		1040	
11. „	76.	1820		1270	95 Cal.	2460		1070	
16. „	81.	1930		1300		2530		1040	
21. „	86.	1980		1340		2665		1015	
26. „	91.	2045		1305		2625		915	
31. „	96.	2050	6 Tage	1355		2760	5 Tage	gestorb. unter Zeichen der Inanition am 91. Tage	
			195 Cal.				225 Cal.		
5. Juni	101.	2100	12 Tage	1240	15 Tage	2790	10 Tage		
10. „	106.	2105	180 Cal.	1230	90 Cal.	2780	230 Cal.		
15. „	111.	2225		1325		2790			
20. „	116.	2120		1195		2835			
25. „	121.	2120		1160	25 Tage	2865	30 Tage		
30. „	126.	2290	32 Tage	1160	100 Cal.	2925	250 Cal.		
5. Juli	131.	2300	240 Cal.	1070		3030			
10. „	136.	2290		getötet am 136. Tage		2990			
15. „	141.	2345				getötet am 141. Tage			
20. „	146.	2375							
		getötet am 146. Tage							

Versuch 4.

Datum	Versuchstag	A Gewicht	A Calorien pro Tag	B Gewicht	B Calorien pro Tag	C Gewicht	C Calorien pro Tag	D Gewicht	D Calorien pro Tag
1909									
1. Aug.	1.	1250	340	1380	225	1520	225	1295	340
11. „	11.	1330	340	1480	225	1580	225	1425	340
21. „	21.	1490	225	1590	225	1700	225	1500	340
31. „	31.	1705	225	1715	200	1935	110	1700	225

Versuch 4 (Fortsetzung.)

Datum	Versuchstag	A		B		C		D	
		Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag	Gewicht	Calorien pro Tag
1909									
10. Sept.	41.	1860	110	1860	225	1920	110	1900	225
20. „	51.	1990	110	2080	225	2010	170	als Kontrolltier getötet u. analysiert	
30. „	61.	1935	110	2250	340	2130	225		
10. Okt.	71.	1935	110	2650	410	2370	270		
20. „	81.	1920	110	3090	420	2680	270		
30. „	91.	1860	135	3325	440	2795	300		
9. Nov.	101.	1850	170	3610	440	2970	300		
19. „	111.	1940	170	3885	500	3130	300		
29. „	121.	2020	170	4110	500	3340	300		
9. Dez.	131.	2015	170	4460	500	am 123. Tage gestorben			
19. „	141.	1960	170	4595	500				
29. „	151.	1990	170	5010	500				
1910									
8. Jan.	161.	2010	170	5020	500				
18. „	171.	1950	170	5100	500				
28. „	181.	2050	170	5270	550				
7. Feb.	191.	2040	170	5510	570				
17. „	201.	2180	170	5605	570				
27. „	211.	2230	170	6090	570				
9. März	221.	2100	170	6140	570				
19. „	231.	2315	170	6335	570				
29. „	241.	2310	170	6370	570				
9. April	251.	2220	170	6400	570				
19. „	261.	2165	170	6290	570				
29. „	271.	2150	170	6250	570				
9. Mai	281.	2300	170	6350	570				
19. „	291.	2220	170	6360	680				
29. „	301.	2400	170	6400	680				
8. Juni	311.	2440	170	6460	680				
18. „	321.	2320	170	6500	680				
28. „	331.	2350	170	6690	680				
8. Juli	341.	2400	170	6800	680				
18. „	351.	2450	170	6800	680				
28. „	361.	2510	250	6850	680				
7. Aug.	371.	2650	340	6700	680				
17. „	381.	2790	340	6700	680				
27. „	391.	3000	340	6650	680				
6. Sept.	401.	3220	340	6700	680				
16. „	411.	3225	340	6835	680				
26. „	421.	3470	450	7000	680				

Der Versuch wird fortgesetzt!

Über das Schicksal von injizierten artfremden Eiweißkörpern und Peptonen.

Von

H. De Waele und A. J. J. Vandevelde.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität und aus dem Laboratorium der Stadt Gent.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1910.)

Wenn Proteine auf abnormalen Wegen in den Organismus hineingebracht werden, erzeugen dieselben charakteristische Reaktionen, nämlich das Auftreten von Präcipitinen im Blutserum und von Eiweiß im Harn.

Das praktische Interesse dieser Frage tritt hauptsächlich dann zutage, wenn es sich darum handelt, öfters große Mengen Serum zu injizieren; es ist besonders von den Autoren berücksichtigt worden, die die Serumkrankheit studierten. So fanden v. Pirquet und Schick in einzelnen Fällen, daß zugleich mit den anderen Symptomen der Serumkrankheit und deren Exanthem eine Albuminurie auftritt von ungefähr $^1/_4$ ‰, wenn Mengen von 100 bis 200 ccm Serum eingespritzt wurden. Diese Albuminurie ist von kurzer Dauer, sie besteht kaum länger als 14 Tage. Im Urin findet man nur hyaline Zylinder.

Eine Injektion von Eierklar beim Kaninchen ist immer von einer Albuminurie begleitet, und die Frage der Identität des im Urin enthaltenen Proteins wurde von verschiedenen Forschern untersucht.

Ascoli fand mittels der Präcipitinmethode, daß das Protein teilweise vom injizierten Eiweiß und teilweise vom Tierkörper herrührte. Fr. Hamburger konnte diese Resultate bestätigen und zeigen, daß diese Albuminurie bei späteren Einspritzungen geringer wurde, wenn dieselben in Zwischenräumen von 8 bis 10 Tagen voneinander vorgenommen wurden. Diese Erscheinung deutete Hamburger als lokale Zellimmunität.

Daß Injektionen nach kürzeren Terminen nicht vertragen werden, kann man jetzt besser verstehen, seitdem man die Anaphylaxie kennen gelernt hat.

Untersuchungen von De Waele und später von Vaughan, von Biedl und Kraus, von Pfeiffer und Mita haben dargetan, daß die Serumanaphylaxie erzeugt wird durch die Spaltung resp. Peptonisierung von Eiweiß und einer Peptonvergiftung entspricht.

Die betreffende Peptonbildung geht schneller und intensiver vor sich bei einer zweiten oder dritten Einspritzung.

Wieviel von dem injizierten Eiweiß peptonisiert, was aus diesem Pepton wird, ob dasselbe im Urin wiedergefunden wird, ober ob eine Beziehung zwischen dieser Peptonbildung und der Erscheinung von Albumin im Harn besteht, das sind die Fragen, die wir uns zur Lösung vorgelegt haben.

Zu unseren Untersuchungen benutzten wir womöglich Kaninchen von einem mittleren Gewicht von ca. 2500 bis 3500 g. Dieselben erhielten täglich 300 bis 400 g Mohrrüben und 75 bis 100 g Hafer. Diese Diät zeigte sich als genügend, um die Tiere im Nahrungsgleichgewicht zu halten; sie entspricht einer Aufnahme von ungefähr 1,82 g N.

I. Subcutane Injektionen von Pepton.

Diese Experimente — obwohl später wie die anderen und nur zum Vergleich gemacht — führen wir zuerst an, weil dieselben Anhaltspunkte für das übrige geben.

Es wurde schon von Nolf und Hougardy gezeigt, daß Einspritzungen von Witte-Pepton in genügender Menge das Stickstoffbedürfnis des Hundes decken und das Stickstoffgleichgewicht erhalten können. Dadurch wird die Möglichkeit einer Assimilation des Peptons festgestellt.

Zum Zwecke unserer Untersuchungen haben wir Witte-Pepton, als ein konstantes Produkt, einem eigens dargestellten Pepton aus Eierklar vorgezogen.

A. Mittlere Dosen.

Kaninchen 1 (s. Protokolle), 3650 g schwer, auf Nahrungsgleichgewicht gebracht, bekommt weiter 400 g Mohrrüben und 100 g Hafer. Das entspricht etwa 2 g N; es wird eine etwas geringere Menge durch den Harn ausgeschieden; ein Teil geht durch die Faeces wahrscheinlich verloren.

In den 5 Tagen vor der Injektion wurden im ganzen 7,3344 g N im Urin als Excreta gefunden, was auf 12 Tage berechnet etwa 17,6025 g N ausmachen würde.

In den 12 Tagen nach der Injektion von 1 g Witte-Pepton (i. e. 0,1499 g N) wurden nur 16,4016 g N ausgeschieden.

Es wurden somit 1,2010 g N weniger ausgeschieden, obwohl das Tier nur 0,1499 g N als Zugabe durch die Injektion erhalten hatte.

Andererseits war das Tier durch die Einspritzung erkrankt, hatte teilweise seine Nahrung verweigert und dadurch weniger N zu sich genommen.

Es darf angenommen werden, daß hier ungefähr Gleichgewicht zwischen Einnahme und Ausgabe besteht.

B. Kleinere und wiederholte Dosen.

Kaninchen 2 (s. Protokolle), auf Nahrungsgleichgewicht gebracht mit 400 g Mohrrüben und 75 g Hafer, bekommt eine Einspritzung von 0,2 g Witte-Pepton. Es verträgt dieselbe ohne Schaden, und die Ernährung geht ungeändert weiter während dieser ersten Hälfte des Experimentes.

Aus den bekannten Zahlen läßt sich berechnen, daß das Tier in 5 Tagen 8,030 g N ausgeschieden hätte. In den 5 Tagen aber, die auf die Injektion folgen, wurde eine Ausscheidung von 5,646 g N + 0,0161 g Albumin, i. e. 0,0025 g N beobachtet: im ganzen 5,6468 g N. Die Injektion betrug nur 0,031 g N. Hier hat demnach Ansatz stattgefunden.

11 Tage später bekommt das Tier eine zweite Einspritzung, dieses Mal von 1 g Witte-Pepton. Dieselbe wird weniger gut vertragen; das Tier frißt die Mohrrüben nur teilweise auf.

In 3 Tagen hatte es 3,276 g N ausgeschieden, und in den 3 folgenden Tagen wurde eine Ausscheidung von 3,285 g N beobachtet. Die Injektion betrug 0,1499 g N. Da aber andererseits die Nahrungsaufnahme geringer war, darf man in diesem Fall ungefähr Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Exkreten annehmen.

Kaninchen 3 (s. Protokolle) bekommt unter denselben Umständen wie das vorige ein erstes Mal 0,2 g Witte-Pepton.

Es hätte der Berechnung zufolge in 5 Tagen 6,175 g N ausgeschieden, gab aber in den 5 Tagen nach der Injektion nur 5,549 g N.

Es wurden demnach 0,608 g N zurückgehalten, obwohl die Einspritzung nur 0,03 g N betrug. Hier war wiederum Ansatz.

Die zweite Injektion, 13 Tage später vorgenommen, bestand aus 1 g Witte-Pepton und wurde gut vertragen.

Nach Berechnung wäre die Exkretion in den 4 folgenden Tagen 3,096 g N gewesen, sie betrug aber 2,846 g N.

Es wurden demnach 0,250 g N zurückgehalten. Die Injektion hatte 0,1499 g N betragen; demnach darf man hier auf Gleichgewicht schließen.

Resumé. Es findet bei Injektion von kleinen Mengen Pepton ein gewisser Ansatz von Stickstoff statt; bei großen Dosen gleichen sich ungefähr Aufnahme und Excreta aus.

II. Subcutane Injektionen von Eiweiß (Eierklar).

A. Einzelne Dosis.

Kaninchen 4 (s. Protokolle), in Nahrungsgleichgewicht mit 300 g Mohrrüben und 75 g Hafer, nimmt infolgedessen 1,8 g N pro Tag zu sich.

Es bekommt eine Einspritzung von 25 ccm Eiklar, i. e. ungefähr 0,375 g Albumin resp. 0,05 g N.

In den 17 folgenden Tagen, hauptsächlich vom 2. Tage an, findet man im ganzen 1,370 g Albumin im Harn: die injizierte Menge betrug nur 0,375 g Eiweiß. Das Tier gab demnach 268% mehr ab.

Als nicht koagulabele Stickstoffsubstanzen hätte es nach Berechnung mit den bekannten Zahlen in diesen 17 Tagen 19,737 g N ausscheiden müssen.

Es wurden aber 20,810 g N gefunden, i. e. 1,073 g N mehr.

Andererseits war das Tier krank, verweigerte teilweise seine Nahrung während 6 bis 7 Tagen und hat auf diese Weise etwa 10 g N weniger zu sich genommen.

Das totale Defizit an N beträgt demnach mindestens 12 g N resp. 75 g trocknen Albumins. Das Tier hat entsprechend 290 g an Gewicht verloren.

B. Kleine wiederholte Dosen.

Kaninchen 5 (s. Protokolle) erhält unter denselben Umständen wie das vorige 10 ccm Eiklar, i. e. ungefähr 0,14 g Albumin. Vom nächsten Tage an und in den 4 folgenden Tagen findet man im Harn 0,4256 g Eiweiß, i. e. 204% mehr als der Betrag der Injektion.

Nach Berechnung hatte das Tier in diesen 4 Tagen 5,3960 g N ausgeschieden. Es werden aber nur 4,8325 g N + 0,008 g N (den 0,4256 g Eiweiß im Harn entsprechend), i. e. im ganzen 4,8405 g N gefunden.

Die Experimente 5 und 6 waren aber chronologischerweise unsere ersten, und es wurden dabei die Mengen der verweigerten Nahrung nicht genau abgewogen; die tägliche Aufnahme des Gewichtes der Tiere gibt aber eine zuverlässige Andeutung für die Gesundheit oder Krankheit der Tiere.

In diesem Fall (Nr. 5) z. B. hat das Tier nichts an Gewicht verloren und ist gesund geblieben; es läßt sich hieraus schließen, daß die Ernährung kein Defizit erlitten hat.

Der Unterschied von 0,5565 g N zwischen der Berechnung und der Beobachtung der Excreta spricht demnach für eine geringe Stickstoffretention.

Bei der zweiten Injektion bekommt das Tier eine ähnliche Menge wie bei der ersten. Es gibt nur 0,0717 g Albumin ab, i. e. 48% mehr als die Menge des injizierten Eiweißes, und dies nur in den 2 ersten Tagen.

Es läßt sich weiter berechnen, daß das Tier in 8 Tagen 8,6336 g N ausgeschieden hätte, es wurde eine Exkretion von 8,4588 g N (wovon 0,0109 g N von dem Albumin herrühren) beobachtet.

Die Retention von 0,1748 g N gleicht sich mit dem Wert der Injektion, i. e. 0,1499 g N aus. Auch dieses Tier hat in seiner Ernährung keine Verringerung erlitten.

Man darf demnach hier auf Gleichgewicht schließen.

C. Wiederholte große Dosen.

Kaninchen 6 (s. Protokolle), unter denselben Umständen wie die vorigen, bekommt zum erstenmal eine Einspritzung von 10 ccm Eiklar, i. e. 0,14 g Albumin. In den 3 folgenden Tagen, hauptsächlich vom nächsten Tage ab, verliert es 0,37 g Eiweiß, i. e. 167% mehr.

Es läßt sich berechnen, daß die Exkretion in 4 Tagen 3,383 g N betragen hätte. Dieselbe war in den 4 Tagen nach der Injektion 4,021 g N. Dazu muß man 0,06 g N (von dem Eiweiß) hinzufügen. Im ganzen eine Vermehrung von 0,144 g N.

Somit beobachtet man einen zu großen Verlust von Eiweiß und Harnstoff. Für die Ernährung gilt dieselbe Bemerkung wie für Kaninchen 5.

7 Tage später erhält das Tier eine zweite Einspritzung, dieses Mal von 25 ccm Eiklar, i. e. 0,375 g Eiweiß.

Vom 2. Tage an und während 7 Tagen verliert es 0,8249 g Eiweiß, i. e. 120% mehr.

Die Excreta, die sich auf 8,4326 g für dieselbe Zeit berechnen lassen, waren 7,7063 g N + 0,131 g N (von dem Eiweiß).

Somit beliefen sich dieselben auf 0,595 g N weniger. Die Injektion hat 0,06 g N betragen. Die tägliche Gewichtsabnahme aber zeigt, daß das Tier von der Einspritzung krank wurde und daß die Ernährung darunter gelitten hat. Es scheint demnach hier Gleichgewicht stattgefunden zu haben.

Bei der dritten Injektion, 12 Tage später vorgenommen, bekommt das Tier wiederum 25 ccm Eiklar, i. e. 0,375 g Eiweiß. Es verliert in den 6 folgenden Tagen 0,8403 g Eiweiß (im Harn), i. e. 124% mehr.

Statt einer Exkretion von 6,8994 g N, wie berechnet, beobachtet man 8,9814 g N + 0,117 g N (vom Eiweiß), i. e. eine Vermehrung von 2,1990 g N. Dazu muß in Betracht gezogen werden, daß die Gewichtsabnahmen zeigen, daß das Tier erkrankt war, und in unserem Notizbuch ist angedeutet, daß in den 3 ersten Tagen das Tier fast nichts gefressen hat. Dadurch vermehrt sich das Defizit um ungefähr 4 g N und erreicht im ganzen 6 g N. Diese 6 g N stimmen mit ungefähr 39 g Eiweiß überein, und das Tier hat etwa 100 g an Gewicht verloren.

Resumé. Aus diesen Experimenten ersieht man, daß ein Tier, das eine Einspritzung von artfremdem Albumin bekommt, durch den Harn Eiweiß verliert, das teilweise aus seinem eigenen, teilweise aus dem injizierten Eiweiß besteht, und dessen Summe die injizierte Menge bedeutend übertrifft.

Für kleine Dosen ist die Harnstoffausscheidung nicht verändert, große Dosen rufen nicht nur einen Verlust an Eiweiß.

sondern auch an Harnstoff hervor, als Zeichen einer gewissen Intoxikation und Eiweißabbaues.

Bei einer zweiten Injektion ist der Eiweißverlust schon viel geringer und die Harnstoffexkretion unverändert. Im Gegenteil, wenn die Dosen zu stark sind und in zu kurzer Zeit aufeinander folgen, werden sie nicht gut vertragen, und die Resultate deuten auf eine Intoxikation.

Zur Erleichterung der Deutung unserer Resultate sei es uns erlaubt, einzelne bekannte Tatsachen heranzuziehen.

Das eingespritzte Eiweiß läßt sich bis zum 4. Tage im Blute des Tieres nachweisen, weniger lange aber bei einer zweiten Injektion. Diese Beobachtung, die sich nur andeutungsweise in dem Experimente von Hamburger (Eierklar beim Kaninchen) vorfindet, war viel deutlicher in den Untersuchungen von v. Pirquet und Schick (Pferdeserum bei Kaninchen).

Das Serum kreiste im Blut bis zum 11. Tage und bei der Reinjektion nur bis zum 8. Tage.

Auch das eingespritzte Pepton bleibt mehr als 24 Stunden nachweisbar.

Es wurde andererseits durch eine Arbeit von De Waele bewiesen und von Biedl und Krauß, von Vaughan, von Pfeiffer und Mita bestätigt, daß die eingespritzten Eiweißstoffe sich allmählich in Peptone umwandeln und daß diese Umänderung bei einer zweiten Injektion schneller und intensiver abläuft.

Wenn wir jetzt die Resultate unserer Untersuchungen mit diesen Tatsachen in Einklang zu bringen versuchen, so läßt sich folgende Deutung annehmen:

Es ist noch von dem injizierten Eiweiß als solchem etwas im Blut vorhanden zu einer Zeit, wo das Tier durch den Harn schon mehr Eiweiß verloren, als es bekommen hat. Es ist demnach wahrscheinlich, daß das Eiweiß als solches in den Kreislauf aufgenommen und nur allmählich daselbst peptonisiert wird. Ob das injizierte Eiweiß sich mit dem Tiereiweiß vor der Ausscheidung verbindet oder ob das verlorene Tiereiweiß ohne Verbindung durch lokale Reizung der Niere entsteht, bleibt fraglich.

Wird sämtliches eingespritztes Eiweiß ausgeschieden? Da sich Präcipitine bilden und da sich das Tier dem fremdartigen Eiweiß angewöhnt und dasselbe später nicht mehr durch den Harn verliert, so erscheint es wahrscheinlich, daß bei wieder-

holter Einspritzung ein immer größer werdender Teil peptonisiert und teilweise fixiert wird, und daß dasselbe teilweise als Harnstoff zur Ausscheidung gelangt infolge eines autoregulatorischen Mechanismus, der auch bei einer normalen Digestion einer an Eiweiß reichhaltigen Mahlzeit hervortritt. Bei einer zweiten Einspritzung ist die Peptonisierung verstärkt und beschleunigt. Das Tier kann demnach weniger Eiweiß abgeben, und eine lokale Zellimmunität der Niere ist zur Erklärung nicht nötig. Das Pepton wirkt weniger giftig als Eiweiß, wird besser vertragen und der Überschuß als Harnstoff ausgeschieden.

Nur bei der Einspritzung von großen Eiweißmengen ist der Organismus mit toxischem Eiweiß überschwemmt; ein großer Teil übt als solches eine giftige Wirkung aus, ein geringer wird peptonisiert, weiter zu Harnstoff abgebaut und als solcher eliminiert. Dazu gesellen sich die Folgen der allgemeinen Intoxikation mit Abbau der eigenen Substanz des Tieres. Das Nahrungsgleichgewicht ist gestört, das Tier erkrankt und verliert an Gewicht.

Protokolle.

Kaninchen 1.

Datum	Gewicht	Urin					Ernährung	
		Menge	Spez. Gew.	N	Albumin	Pepton	Mohrrüben	Hafer
	g	ccm	g	g	g	g	g	g
4. II.	3650	230	1,018	1,3653			400	100
5. „	3620	326	1,018	2,0082			400	100
6. „	3620	290	1,015	1,0962			400	100
7. „	3600	286	1,014	1,3625			400	100
8. „	3600	290	1,015	1,5022			330	100
Injektion von 1 g Witte-Pepton in 30 ccm Kochsalzlösung.								
9. II.	3460	110	1,028	1,6940	Spur	0	0	0
10. „	3570	100	1,024	1,4336	„	0	210	100
11. „	3550	130	1,024	1,3106	0	0	238	100
12. „	3580	134	1,023	1,5008	0	0	265	100
13. „	3580	158	1,026	1,8418			213	100
14. „	3580	140	1,023	1,2740			250	100
15. „	3580	160	1,021	1,0572			261	100
16. „	3580	138	1,021	1,1245			274	100
17. „	3580	152	1,021	1,2980			182	100
18. „	3500	166	1,025	1,5332			129	58
19. „	3500	84	1,032	1,2560			240	90
20. „	3590	77	1,029	1,0780			400	100

Kaninchen 2.

Datum	Gewicht	Urin					Ernährung	
		Menge	Spez. Gew.	N	Eiweiß	Pepton	Mohrrüben	Hafer
	g	ccm	g	g	g	g	g	g
12. XI.	3770						400	75
13. „	3770	210					400	75
14. „	3665	340					400	75
15. „	3700	250					400	75
16. „	3660	355	1,015				400	75
17. „	3720	235	1,017	1,324			400	75
18. „	3620	380	1,015	1,888			400	75
Erste Injektion: 0,2 g Witte-Pepton in 20 ccm.								
19. „	3600	315	1,017	1,515	0	0	400	75
20. „	3800	110	1,020	0,682	0,0161	0	400	75
21. „	3810	310	1,012	1,293	0	0	400	75
22. „	3780	290	1,015	1,0434	0	0	400	75
23. „	3700	245	1,015	0,8506	0	0	400	75
30. „	3630	205	1,018				400	75
1. XII.	3660	240	1,015	1,0920	0	0	160	75
Zweite Injektion: 1 g Witte-Pepton in 20 ccm.								
2. „	3500	210	1,017	1,323	0	Spur	310	75
3. „	3520	190	1,017	1,223	0	„	340	75
4. „	3620	120	1,016	0,739	0	0	380	75
5. „	3570	320	1,015			0	400	75

Kaninchen 3.

Datum	Gewicht	Urin					Ernährung	
		Menge	Spez. Gew.	N	Eiweiß	Pepton	Mohrrüben	Hafer
	g	ccm	g	g	g	g	g	g
12. XI.	3800						400	75
13. „	3885	190					400	75
14. „	3780	305					400	75
15. „	3850	200					400	75
16. „	3770	340	1,018				400	75
17. „	3790	190	1,019	0,832			400	75
18. „	3740	295	1,019	1,632			400	75
Erste Injektion: 0,2 g Witte-Pepton in 20 ccm.								
19. „	3800	175	1,019	0,943	0	0	400	75
20. „	3700	340	1,016	1,669	0	0	400	75
21. „	3710	220	1,012	1,053	0	0	400	75
22. „	3700	270	1,012	1,149	0	0	400	75
23. „	3650	175	1,015	0,735	0	0	400	75
30. „	3630	260	1,015				400	75
1. XII.	3660	194	1,014	0,633	0	0	400	75
Zweite Injektion: 1 g Witte-Pepton in 20 ccm.								
2. „	3700	210	1,015	1,073	0	Spur	400	75
3. „	3590	370	1,014	1,010	0	„	400	75
4. „	3650	195	1,015	0,763	0	0	400	75
5. „	3630	230	1,013		0	0	400	75

Kaninchen 4.

Datum	Gewicht	Urin					Ernährung	
		Menge	Spez. Gew.	N	Eiweiß	Pepton	Mohrrüben	Hafer
	g	ccm	g	g	g	g	g	g
8. I.	2960	244	1,014	1,161	0	0	300	75
Injektion: 25 ccm Eierklar.								
9. „	2950	200	1,021	1,624	0,060	Spur	210	0
10. „	2870	59	1,040	1,537	0,204	„	0	0
11. „	2800	75	1,044	1,890	0,191	„	0	0
12. „	2670	60	Klumpen	1,159	0,073	„	0	0
13. „	2540	87	„	1,610	0,114	„	0	0
14. „	2450	90	„	1,371	0,104	„	200	0
15. „	2480	110	1,025	1,786	0,088	„	213	17
16. „	2520	63	Klumpen	1,362	0,113	„	214	75
17. „	2590	71	1,046	1,252	0,176	„	300	75
18. „	2590	70	1,038	1,259	0,099	„	300	75
19. „	2660	165	1,021	1,140	0,057	„	300	75
20. „	2630	160	1,018	0,616	0,023	„	300	75
21. „	2630	170	1,017	0,904	0,013	„	300	75
22. „	2690	146	1,019	0,917	0,009	„	300	75
23. „	2650	234	1,018	0,969	0,007	0	300	75
24. „	2670	182	1,019	0,713	0,003	0	300	75
25. „	2670	180	1,020	0,701	0,036	0	300	75

Kaninchen 5.

Datum	Gewicht	Urin				
		Menge	Spez. Gewicht	N	Eiweiß	Pepton
	g	ccm	g	g	g	g
25. XI.	2600	335	1,014	—	—	—
26. „	2570	219	1,015	1,0792	0	—
Erste Injektion: 10 ccm Eierklar.						
27. „	2590	149	1,018	1,0346	0,2086	—
28. „	2700	108	1,012	0,8165	0,0622	—
29. „	2650	265	1,016	1,3356	0,1548	—
30. „	2670	155	1,017	0,7378	0	—
1. XII.	2770	112	1,017	—	—	—
2. „	2790	180	1,018	—	—	—
3. „	2760	230	1,017	0,9080	Spur	—
Zweite Injektion: 10 ccm Eierklar.						
4. „	2750	195	1,015	1,2667	0,0608	
5. „	2800	210	1,015	1,0055	0,0109	Spur
6. „	2880	130	1,011	0,6110	0	
7. „	2850	263	1,013	1,1625	0	0
8. „	2820	240	1,014	0,9480	—	
9. „	2760	214	1,015	1,2754	—	
10. „	2750	230	1,015	1,0948	—	
11. „	2740	190	1,015	1,0954	—	0
12. „	2760	200	1,014	—	0	0
13. „	2790	194	1,015	—	0	0
14. „	2800	202	1,016	—	0	0

Kaninchen 6.

Datum	Gewicht	Urin					Bemerkungen
		Menge	Spez. Gew.	N	Eiweiß	Pepton	
	g	ccm	g	g	g	g	
25. XI.	2800	145	1,017	—	—	—	
26. „	2770	132	1,013	0,7666	0	—	
		Erste Injektion: 10 ccm Eierklar.					
27. „	2770	166	1,017	1,2828	0,1739	—	
28. „	2770	115	1,017	0,8661	0,1355	—	
29. „	2770	90	1,022	0,6628	0,0650	—	
30. „	2800	100	1,018	0,6132	0	—	
1. XII.	2770	147	1,018	—	—	—	
2. „	2790	98	1,021	—	—	—	
3. „	2800	92	1,020	0,5970	Spur	—	
		Zweite Injektion: 25 ccm Eierklar.					
4. „	2860	90	1,021	0,4410	0,0729	Spur	
5. „	2850	115	1,019	0,9490	0,3245	0	
6. „	2860	84	1,021	0,6350	0,1131	0	
7. „	2850	113	1,017	0,6769	0,0818	0	
8. „	2800	130	1,015	0,6955	0,0809		
9. „	2800	135	1,012	0,4158	0,0737		
10. „	2780	130	1,015	0,6812	0,0780		
11. „	2790	115	1,018	0,8050	0	0	
12. „	2780	160	1,015	1,0304	—	0	
13. „	2760	85	1,017	0,5617	0	0	
14. „	2760	150	1,016	0,8148	0	0	
		Dritte Injektion: 25 ccm Eierklar.					
15. „	2790	18	—	0,1462	Spur	0	Krank, frißt nicht.
16. „	2750	52	1,032	1,2318	0,4692	0	„ „ „
17. „	2750	51	1,048	1,7850	0,2199	0	„ „ „
18. „	2820	95	1,027	1,7423	0,0895	0	
19. „	2760	260	1,014	1,3832	0,0541	0	
20. „	2740	136	1,013	0,6854	0,0076	0	
21. „	2710	130	1,015	0,7826	0	0	
22. „	2670	122	1,018	0,7174	0	0	
23. „	2670	106	1,014	0,5075	0	0	

Zur Chemie der Honigbildung.

Von

M. Küstenmacher (Steglitz).

(Eingegangen am 3. Dezember 1910.)

Mit 1 Figur im Text und 1 Tafel.

I.

Der Honig ist ein uraltes Genußmittel des Menschen.

Es war bekannt, daß die Bienen die Süßstoffe in der Natur sammeln und in die Wachszellen ihres Baus speien, eindicken und verdeckeln.

In der Chemie des Honigs war ferner bekannt, daß im Honig außer den Hauptmengen von Invertzucker und Wasser noch geringere Mengen von Rohrzucker, ev. anderen Zuckerarten, Dextrinen, Ameisensäure und anderen Säuren, anorganischen Stoffen (Aschenbestandteilen) und Eiweißkörpern vorhanden sind.

Erlenmeyer und v. Planta wiesen 1874 im Honig ein invertierendes und diastasierendes Ferment nach, und Langer[1]) fällte die Invertase verschiedener Honigarten und prüfte ihre Kraft an Rohrzuckerlösung. Er wies nach, daß das Honigeiweiß arteigenes Sekret der Honigbiene sei und gründete hierauf eine serologische Honiguntersuchung.

Über die Umbildung des Nectars in Honig fand ich nirgends in der Literatur einen Anhalt, und so habe ich in nachstehendem einen Versuch gemacht, den ich der Verbesserung und Vervollständigung empfehle.

Die in Betracht kommenden Nectarquellen habe ich in der „Bienenzucht in Theorie und Praxis,"[2]) Jahrg. 18, Nr. 11 aufgeführt, und es sei hier nur darauf hingewiesen, daß außer den Nectarien der Blüte auch diejenigen von den Bienen besucht werden, die sich an anderen Teilen der Pflanze in normalem Zustande befinden oder auch die krankhaften Veränderungen (Gallen), die zur Zuckerausscheidung Veranlassung geben.

---

[1]) Arch. f. Hygiene 71, 313.

[2]) Verlag Pfenningstorff, Berlin.

Im Pflanzenkörper haben wir in den betreffenden Organen immer dieselbe Erscheinung, daß in den Zellen Stärkemengen eingelagert werden, die beim Erscheinen des Sekrets verschwinden und als Rohrzucker in saurer, gerbstoffhaltiger Lösung, die manchmal noch Stärke und bei gewissen Pflanzen auch Bassorin usw. enthält, hervortreten.

Ob von der Natur durch Ausflüsse der Pflanzen erzeugt oder vom Menschen künstlich angeboten, wirkt doch nur der Zuckergehalt aller dieser Quellen auf die Biene, macht sie zur Aufnahme empfänglich und regt sie zur Umwandlung desselben in Honig, ja sogar zur Erhöhung ihres Trieblebens an.

Betrachten wir die Nectarquellen der Blüten, für welche die Biene eigentlich geschaffen ist, so begegnen wir schon einer so großen Verschiedenheit, daß sie häufig nur dadurch übereinstimmen, daß sie einen Zuckergehalt haben, der meist auch noch in der Menge und in der Art differiert.

Noch größer ist der Unterschied in den extrafloralen Nectarquellen, und künstlich kann man mit der Zuckerlösung von der Biene fast alles eintragen lassen, was man dazu mischt.

Ich prüfte den Nectar von Syringa vulgaris zu der Zeit, als die Blüten von meinen Bienen des Nectars wegen, und zwar nur ausnahmsweise beflogen wurden, da meist nicht ein so hoher Nectarstand in der Blütenröhre vorhanden ist, daß ihn die Bienen erreichen.

Der Nectar reagierte sauer, gab mit Kalkwasser einen leichten Niederschlag, der sich in Kalilauge nicht löste, und gab mit Eisenchlorid Gerbstoffreaktion. Mit Ätheralkohol ließen sich zarte Kryställchen von Rohrzucker abscheiden, die Fehlingsche Lösung erst nach der Invertierung mit Salzsäure reduzierten. Eiweiß und Phosphate konnte ich darin nicht nachweisen.

Zum Unterschiede von diesem Nectar erwähne ich den von Calluna vulgaris, der zwar wegen seiner winzigen Mengen schwieriger zu prüfen ist, aber unter dem Mikroskop schon Pollen und verquollene Viscinstücke zeigt, durch welche die Pollenkörner zu Tetraden verklebt bleiben. Diese Viscinstücke hatte ich früher schon als integrierenden Bestandteil des Heidehonigs erkannt.

Außerdem findet man häufig Flugsand darin.

Die Bienen bringen alle diese Stoffe, sei es aus Mangel an Intelligenz oder aus dem Unvermögen, die festen Stoffe

liegen zu lassen, mit in die Honigzelle, so daß der Heidehonig aus sandiger Gegend einen recht hohen Aschengehalt aufweist, da er direkt sichtbare Sandkörner enthält.

Dieser Nectar enthält aus dem Pollen daher auch Eiweißstoffe, Phosphate und Invertzucker und ist von dem von Syringa sehr verschieden, trotzdem er auch Blütennectar ist.

II.

Der Verdauungsweg der Biene. (Vgl. beiliegende Tafel.)

Den Verdauungsweg der Biene kann man mit verschiedenen Namen benennen, je nachdem man ihn von dem einen oder dem anderen Gesichtspunkte aus betrachtet.

Ordnet man ihn nach topographischen Gesichtspunkten, so spricht man von einem Vorder-, Zwischen-, Mittel- und Enddarm; vom morphologischen topographischen Standpunkte müssen wir schon im Kopf, von der Mundöffnung an, einen Schlund, im Thorax eine Speiseröhre, im Hinterleibe Honigblase, Magenmund, Mitteldarmschlinge (Chylusmagen) mit Malpighischen Gefäßen, Enddarmschlinge und Kotblase mit After unterscheiden.

Betrachten wir aber den Verdauungsweg nach der Funktion der einzelnen Teile, machen wir nur physiologische Prinzipien geltend, so müssen wir die Honigblase Honigkropf oder Honigmagen, den Mitteldarm Chylusmagen oder im Gegensatz zum Honigmagen besser Pollenmagen, den Enddarm Dünndarm mit Mastdarm nennen, da letzterer nicht nur als Faecesreservoir, sondern mit den 6 Rectaldrüsen ebenfalls als wirklicher Darm funktioniert.

Trotzdem der Honig- und Pollenmagen keine eigentlichen Drüsen enthält, so wird dem einen wie dem anderen Magen Drüsensekret aus Drüsen, die im Kopf und Thorax ihren Sitz haben, zugeführt. Es sind dies im Kopf die Oberkieferspeicheldrüsen, die Schlundspeicheldrüsen und die Kopfzungenspeicheldrüsen. Im Thorax sind es die Brustzungenspeicheldrüsen usw.

Die Zungenspeicheldrüsen münden zusammen an der Zungenwurzel und liefern vielleicht das invertierende Ferment des Honigs, wenn der Honigmagen es nicht selbst produziert oder letzterem aus dem Pollenmagen zugeführt wird und dann überhaupt nicht aus der Biene, sondern, wie wir später sehen werden, aus dem Pollen stammt.

Der Honigmagen.

Da dem Honigmagen in letzter Zeit seine eigentliche Funktion als Magen in Abrede gestellt wurde, so hebe ich hier besonders hervor, daß derselbe als Honigmagen seine Aufgabe durchaus erfüllt, da er durch ein Invertaseferment den Abbau des Rohrzuckers durch Hydrolyse und Sprengung des Moleküls einleitet und bewirkt, so daß derselbe als In-

vertzucker direkt durch die Darmwandung diffundieren und im Körper weiter geleitet werden kann.

Es ist derselbe Abbau, den der Rohrzucker in unserem Magen erfährt oder künstlich im Plasma bei subcutaner Injektion. Er wird in allen Fällen nach derselben Richtung verdaut.

Der Honigmagen ist innen von einer Schleimhaut, Tunica mucosa, überzogen, der eine feine Chitinschicht aufgelagert ist. Die Tunica mucosa besteht aus einer sekretionsfähigen Epithelzellenschicht, darauf folgt die Tunica propria, welche die Verbindung mit den Ring- und Längsmuskeln herstellt. In derselben Weise ist fast der ganze Verdauungsweg ausgestattet, nur daß der Mastdarm statt der Epithelzellenlage 6 Rectaldrüsen eingelagert enthält.

Bei jungen Bienen hat der Honigmagen eine Länge von 2 mm und einen Durchmesser von 1 mm.

Von dem ganzen Honigmagen nimmt fast $^1/_3$ der Verschlußkopf ein. Die Trachtbienen bringen es bei einem gefüllten Magen von 37 bis auf 64 cmm Inhalt.

Durch die Ringmuskeln werden einige flache Rillen gebildet, die den Honigmagen in seinem Umfang einengen, während die Längsmuskeln ihn in der Längsrichtung zusammenziehen und dadurch den Honig durch die Speiseröhre und die Mundöffnung in die Wachszellen befördern.

Der Magenmund.

Von dem Honigmagen gelangt die Nahrung durch einen sehr interessanten Apparat, den Magenmund, auch Zwischendarm genannt, in den Pollenmagen. Von diesem Apparat nennt man das ca. 1 mm große Stück, das in das unterste Drittel des Honigmagens, und zwar von rechts, wenn man die Biene vom Rücken her betrachtet, hineinragt, den Verschlußkopf.

Das Stück zwischen Honig- und Pollenmagen nennt man den Hals, und das $^3/_4$ mm in den Pollenmagen hineinreichende Röhrenstück nennt man den Zapfen oder auch, weil es aus einer doppelten Haut, einer Hautfalte, gebildet wird, die Duplikatur.

Der Verschlußkopf ist in der Literatur nirgends so wiedergegeben, wie er in Wirklichkeit gestaltet ist, denn er ist nicht rund, sondern wie der Bezug eines 4teiligen Regenschirms 4teilig faltig.

Es sind vier bogenförmig abgerundete ⌒ wulstige, fleischige Lippen, die an den Vereinigungsstellen in geschlossenem Zustande die erwähnten Falten bilden, während sie geöffnet einen Trichter darstellen.

An der inneren Fläche jeder Lippe sitzt eine spitzdreieckige, in der Mitte nach innen gekielte Chitinplatte, an deren Rändern hakenförmige, nach unten gerichtete Chitinzähne kammförmig gereiht stehen. Durch diese Zähne macht der Magenmund den Eindruck eines Rachens mit 4 aufklappbaren Kiefern.

Dieser Magenmund wird als Trichter sehr nötig von jungen Bienen zur Beschickung des Pollenmagens mit Pollen zur Brutmilchbereitung

gebraucht. Er legt sich mit seinem wulstigen Rande (Lippen) im oberen Teile des Honigmagens an die Speiseröhre an und fördert den Pollen direkt mit vollständiger Umgehung des Honigmagens in den Pollenmagen, während jener den Verschlußkopf eng umgibt. Andererseits besitzt der Magenmund kräftige Schließmuskeln, durch welche die wulstigen Lippen zusammengepreßt den Honigmagen vom Pollenmagen abschließen, weshalb dieser Teil auch sehr richtig mit dem Namen Verschlußkopf bezeichnet wird.

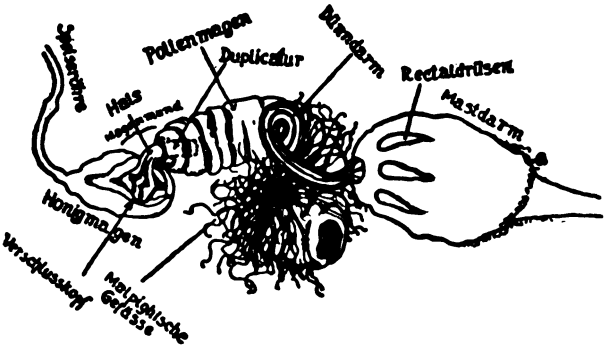


Fig. 2. Verdauungsweg der Biene.

Der untere Teil des Magenmundes, die Röhre des Trichters bildet als Hals ein kurzes Stück überhaupt nur die Verbinduug des Honig- und Pollenmagens und tritt dann als $^3/_4$ mm langes Endstück in den Pollenmagen ein. Dieses röhrenförmige Stück, die Duplikatur, hält man für einen zweiten sehr sinnreichen Verschluß, der nämlich dadurch zustande kommen soll, daß sich das Darmstück umknickt, wenn der Pollenmageninhalt nach der Mundöffnung zu entleert, d. h. erbrochen werden soll. Es wird also hier ein sonst stets pathologischer Zustand, der durch die pathogene Darmknickung herbeigeführt würde, für normal gehalten. Allerdings ist dieser Zustand aber nur von ungeschickter Menschenhand gewaltsam hervorgebracht worden, denn nach physikalischen Gesetzen ist diese Erscheinung nur dann möglich, wenn der Verschlußkopf geöffnet ist.

Dieses Röhrchen, die Duplikatur, ist vielmehr das Ende eines Hebers, den die Biene verschieden tief in den Pollenmagen hineinsenken kann, um den Futtersaft für die Brut aus verschieden tiefen Schichten, frei vom Propolisöl und frei von der Spreu, den untauglichen Pollen und den Pollenschalen, herauszuheben und auf dieselbe Weise wie der Pollen hineingekommen ist, durch Vermittelung des Magenmundes die Brutmilch wieder von sich zu geben. Hier leisten der Ammenbiene die zuvor erwähnten Chitinzähne an den Chitinplatten des Magenmundes treffliche Dienste, da sie wie Harken die Pollenschalen zum Teil zurückhalten.

Der Pollenmagen.

In meiner Abhandlung über Propolis[1]) habe ich nachgewiesen und näher erörtert, daß die Propolis ein Abfallprodukt der Brutmilchbereitung ist und von den Ammenbienen ebenfalls als in der Körperwärme noch sehr flüssiges Propolisöl auf dieselbe Weise aus dem Pollenmagen ausgespien wird.

Zum Finden dieser Stoffe in den verschiedenen Tiefen des ziemlich langen Pollenmagens ist nun dieses Röhrchen da. Die überaus kräftige Ring- und Längs-Muskulatur des Pollenmagens kann diesen harmonikaförmig zusammenschieben und ein kräftiges Erbrechen des Inhaltes bewirken, aber auch zugleich das Röhrchen überallhin fast bis zum Endpunkte des Magens bringen.

Die überaus starke Bewegung des Pollenmagens ist nur dadurch möglich, daß an seinem Ende in einer Schleife in entgegengesetzter Richtung (vgl. die Abbildung) der Dünndarm wie ein loser Gummischlauch sitzt und die starken Bewegungen und Drehungen in der Richtung und um die Längsachse des Abdomens gestattet.

Einige Forscher, wie Schiemenz u. a., behaupten, daß die Brut mit Speichel gefüttert werde und stellen die Fütterung aus dem Chylusmagen (Pollenmagen) in Abrede. Ist mir nun anderwärts eine derartige Speichelfütterung überhaupt nicht bekannt geworden, so verliert diese Annahme vollends jede Berechtigung, da die sichtbaren Beweisstücke meiner Behauptung: „die aus dem Pollenmagen mit übergegangenen Pollenschalen", schon in der 4 Tage alten Made vorhanden sind.

Die beiden Magen, der Honigmagen und der Pollenmagen, sind zwei, jeder vollständig für sich arbeitende Apparate und unterscheiden sich, wie dies ja auch bei unserem Verdauungsweg der Fall ist, durch die Reaktion. Während der Honigmagen saure Reaktion zeigt, ist der Pollenmagen deutlich alkalisch. Es werden Rückstände aus dem Honigmagen, die von ihm nicht absorbiert werden können, während der Tracht, nicht etwa durch den Pollenmagen hindurch in den eigentlichen Darm befördert, sondern sie werden stets durch die Mundöffnung wieder herausgegeben. Im Pollenmagen wird der Pollen durch das den Ammen gleichzeitig zugeführte Wasser gequellt. Der Pollen öffnet sich und entleert seinen Inhalt, das Spermatoplasma, eine Milch, die aus gelösten Proteinen (Eiweißkörpern), Zucker (meist Trauben- resp. Invertzucker) und fettem Öl besteht. Dieses fette Öl hat von Planta in seinen Futtersaftuntersuchungen ebenfalls vor sich gehabt und als Fett bestimmt. Dasselbe stammt also ebenfalls aus dem Pollenmagen, nicht aus den Speicheldrüsen. Wenn auch die Brutmilch stets frisch aus den verschiedenen Tiefen des Pollenmagens kurz nach der Entstehung an die Brut weitergegeben wird, so können doch schon die Fermente, die nachträglich allmählich den Abbau der Eiweißstoffe zu Peptonen und Aminosäuren bewirken, in dem Chymus des Pollenmagens vorhanden sein.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. pharm. Ges., Jg. 21, H. 1.

Die Aminosäuren diffundieren wie der Invertzucker durch die Darmwand, um als Chylus die Bausteine zu neuem Aufbau und zur Erhaltung des Körpers zu liefern.

Meine Untersuchungsergebnisse über die Ruhrkrankheit der Bienen[1]) belehrten mich, daß der Pollenmagen eine recht geringe Verdauungskraft besitzt, die Pollenschalen weder angreift noch aus ihrem Zusammenhang löst, also Cellulose in keiner Form beeinflußt. Es geht sogar so weit, daß ungeformte Kohlenhydrate wie Viscin nicht einmal gelöst und Dextrin nicht aufnahmefähig gemacht werden und zu den Auswurfstoffen gehören.

Eine größere Wahrscheinlichkeit hat daher meine zweite Annahme, die wegen Fehlens der Pepsin abscheidenden Magendrüsen dem Pollenmagen nur das Verdauen eines fertigen Substrates zuerkennt. Die Brutmilch des Pollenmagens ist das Spermatoplasma des Pollenkorns, das bei der Pflanze die zur Befruchtung der Blüte nötigen Pollenschläuche treibt. Diese wachsen durch den Griffel und gelangen bis zur Samenanlage, treiben durch die „Mikropyle" zwischen den Integumenten bis zum Embryosack hindurch und legen sich an diesen an, der Inhalt diffundiert durch die Wandung, um mit der Eizelle zu verschmelzen, d. h. diese zu befruchten. Ebenso wie hier das Spermatoplasma durch die Wandung des Embryosackes diffundiert, kann es auch durch die Magenwand des Pollenmagens diffundieren, und es wäre wohl hier die Annahme berechtigt, daß wir im Spermatoplasma solche Proteine vor uns haben, die ohne weiteres wegen ihrer kleinen Molekülgröße durch die Magenwand als Chylus wandern können.

Diese Annahme wird nun vollends durch die biologische Eiweißdifferenzierung von Dr. Langer, Univ.-Prof. in Graz,[2]) bestätigt, da das Polleneiweiß dieselbe Reaktion, d. h. eine Fällung mit Bienenextraktimmunserum gibt, genau so wie das Honigeiweiß oder der Futtersaft, oder wie der Chylus der Bienenlarven und der erwachsenen Bienen. Den Irrtum Langers, daß das Eiweiß durch den Speichel der Biene in das Bienenbrot gelangt wäre, brauche ich hier nicht zu widerlegen, da ich schon anderen Ortes gezeigt habe, welche Hauptbestandteile sich im Pollen, d. h. im Spermatoplasma befinden, die nicht erst mit dem Speichel hineingelangen. Außerdem habe ich den Beweis auch direkt erbracht,[3]) und somit fällt durch diesen Beweis die gesamte Speichelfütterungslehre.

Da das ausgebildete Insekt der Proteine als aufbauendes Element in geringem Maße, hauptsächlich dagegen noch zur Drüsensekretion und Honigbereitung bedarf und die ausgiebige Benutzung des Pollenmagens in ihren Jugendzustand als Stockbiene fällt, so wird auch das Übermaß an Baustoffen, die bei der Erzeugung der Brutmilch in die Ammenbiene gelangen, vom Körper als Wachs (aus den Wachsdrüsen) mit dem Abfallprodukt Harnsäure (aus den Malpighischen Gefäßen) wieder ab-

[1]) Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 24.

[2]) Arch. f. Hygiene 1, XXI.

[3]) Vgl. unten: Umwandlung des Nectars in Honig.

geschieden. Es entstehen pathologische Wachsschwitzer in der zweiten Hälfte einer starken Brutruhrerkrankung, also nach erfolgter Brutfütterung.[1])

Dünndarm und Mastdarm.

Der Dünndarm und Mastdarm sind also nur dazu bestimmt, die Abfallstoffe aus dem Pollenmagen abzuführen, ev. eine Zeit lang anzustauen, weiter zu verdauen und die Rückstände zum After hinauszuwerfen, die im Jugendzustand der Biene ja auch in großen Mengen als feste Bestandteile, als Pollenschalen vorhanden sind.

Bei den Trachtbienen ist der Inhalt häufig krystallklar und ist dann auch bei den eines natürlichen Todes gestorbenen nur mit spärlicher Bakterienflora durchsetzt. Letztere ist bei vorhandenen Pollenresten reichlicher, besonders in dem angestauten Winterkote, wenngleich man auch diese Menge stets als gering bezeichnen muß. Die Bakterien mögen hier im Mastdarm zur Peptonisierung und Verdauung wesentlich beitragen und somit die Auswurfstoffe verringern helfen.

Der Durchgang vom Pollenmagen zum Dünndarm kann durch einen kräftigen Ringmuskel geschlossen werden.

Malpighische Gefäße.

Bei diesem Muskel mündet eine große Anzahl von Drüsen als tubulöse Einzeldrüsen in den Darm, die Malpighischen Gefäße, welche die als Bausteine nicht verwendbaren Abfallprodukte, wie auch das Übermaß von Wasser aus dem Bienenblute, dem Chylus, abscheiden.

Das Übermaß von Wasser im Blute entsteht bei den Trachtbienen durch Aufnahme des sehr wasserhaltigen Nectars, während der Rohrzucker nicht diffusionsfähig ist und in dem Honigmagen verbleibt.

Dieses Übermaß von Wasser scheiden nun die langen Drüsenröhren, die Malpighischen Gefäße wieder aus, und daher erklärt sich die Erscheinung, daß die Trachtbienen die Abgangsstoffe wie dünnflüssiges Wasser aus dem Mastdarm herausspritzen, während die jungen Stockbienen bei ihren Ausflügen mehr feste (breiige) Exkremente ausgeben.

Die Malpighischen Gefäße entsprechen also gleichsam den Harnkanälchen unserer Nieren. Der Harn der Bienen wird also in den Dünndarm entleert und mit den übrigen Exkrementen ausgeworfen.

III.

Umwandlung des Nectars in Honig.

Der Nectar[2]) ist eine wässerige Lösung von Rohrzucker in wechselndem Verhältnis. Dieser kann in Krystallen aus-

[1]) Vgl. meine Abhandlung über Bienenruhr. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 24.

[2]) Behrens, Die Nectarien der Blüten. Anat.-physiol. Untersuch. Flora 1879. — Bonnier, Les nectaires étude critique, anatomique et physiologique. Ann. d. sc. nat., sér. VI, 8. — Tschirch, Angewandte Pflanzenanatomie. S. 122.

geschieden sein, oder er ist in stärkerer oder schwächerer Lösung, oft nur in einigen Prozenten darin enthalten. Den Rohrzucker können auch andere Kohlenhydrate (Zuckerarten, Dextrine, Gummi, Bassorin usw.) begleiten resp. ersetzen.

Außerdem enthält die Lösung stets Gerbstoff, und zwar am meisten in extrafloralen Nectarquellen, desgleichen geringe Mengen Mineralien und geringe Mengen von Oxalsäure, Apfel- oder Weinsäure und bisweilen Eiweißkörper und Phosphate, die wohl aber nur als Verunreinigung durch verstreuten Pollen anzusehen sind.

Zu diesen Stoffen gesellt sich der Duft des betreffenden Pflanzenteils.

Kosten wir so einen Nectar, so erkennen wir wohl meist einen gewissen Zuckergeschmack und besonders ein recht kräftiges Blütenaroma, aber der Geschmack ist durch die gleichzeitig vorhandenen Oxalate herbe, und oft ist es sogar ein widerlicher Geschmack, wenn nämlich darin Gerbstoff vorwaltet.

Wer sich von der Wahrheit dieser Behauptung überzeugen will, braucht nur den Nectar der Fuchsiablüte zu kosten, die überall zur Hand ist und die auch von den Bienen besucht wird. Man kann hier so recht sehen, in welchem Grade der Geruch und Geschmack von der Einbildung betrogen wird, daß sogar einige Botaniker den sehr korrekten klassischen Ausdruck „Nectar" in „Honig" umgewandelt haben und daher auch von Honigblättern sprechen, während sie das Wort „Nectarium" nicht ganz entbehren können. Den Beweis für diese Inkorrektheit bleiben sie uns schuldig.

Imker haben Gelegenheit, das Zwischenprodukt zwischen Nectar und Honig, den noch nicht fertig verdauten Honig, zu prüfen, der soeben noch als dünnes Wasser in die Wachszellen getragen wurde, aus denen er beim Schräghalten der Waben ausfließt. Auch diesem Produkt, das den Pflanzenduft meist noch in überwältigendem Maße besitzt (ich erinnere hier nur an frisch eingetragenen unreifen Honig von Prunus Padus) und meist von Gerbstoffen noch einen unangenehmen faden Beigeschmack hat, gebührt nicht der Name Honig. Erst wenn die Honigzellen geschlossen sind oder wenigstens der Versuch dazu gemacht wurde, haben wir ein vollwertiges Produkt, das auf den Namen Honig Anspruch machen kann, vor uns.

Betrachten wir nun die mit den einzelnen Stoffen vorgegangene Umwandlung, den Stoffen, die darin geblieben, die

herausgegangen und die neu hinzugekommen sind, so hat sich der Honig folgendermaßen gebildet:

Wasser.

Das Wasser ist bis auf ca. 20% herausgeschafft worden, und zwar die ersten Mengen, wie schon erwähnt, beim Ein- und Umtragen durch den Honigmagen. Die endgültige Abscheidung geschieht im Stock.

Ist am Tage gute Tracht, so rasseln die gewaltigen Exhaustoren des Biens die ganze Nacht. Die Bienen sitzen reihenweise in allen Honiggassen, an der Wandung, auf dem Bodenbrett bis hinaus auf dem Flugbrett und treiben mit den Flügeln die warme wassergesättigte Stockluft hinaus, um frische trocknere kühlere Außenluft einzusaugen. Es wird hierdurch tatsächlich der Honig in den Zellen so weit abgedunstet, daß er die Reife erreicht.

Diese dem Stock über Nacht entweichende Wassermenge wird in kalten Nächten in Form einer dem Flugloch entsteigenden Nebelsäule oder Wolke bei windstillem Wetter sichtbar. Ich hatte diese Erscheinung öfter beobachtet und photographiert.

In eigens dazu konstruierten Stöcken habe ich dieses abgedunstete Wasser gleichsam als Destillat in flüssiger Form aufgefangen und gemessen. Es beträgt bei kräftigen Völkern in guter Tracht pro Nacht bis über 1 l und enthält noch andere flüchtige Körper (Riechstoffe) aus dem Nectar und dem Bienenstock.

Außerdem entweicht aus den Tracheen das Verbrennungswasser der Atmung, das beim Abdampfen ebenfalls mit hinausbefördert wird.

Kohlenhydrate.

Von den Kohlenhydraten, die im Honig die Hauptmenge bilden, wird Rohrzucker in Invertzucker verwandelt. Die Umwandlung ist ziemlich vollständig bis auf einige Prozent schon bei der Verdeckelung durchgeführt. Stärke wird in Dextrin übergeführt. Die übrigen Kohlenhydrate bleiben unverändert.

Gerbstoffe.

Die vorhandenen Gerbstoffe werden oxydiert und schlagen sich zum Teil an der Wandung der Honigzellen nieder.

Säuren.

Die Oxalsäure und deren Derivate sind aus dem Honig bis auf kleine Mengen verschwunden und werden also vom Bienenkörper resorbiert.

Riechstoffe.

Ebenso ist es mit den Riechstoffen, dem Blumenduft, der bis auf Spuren verschwunden und mit dem Wasser abgedunstet worden ist.

Eingefütterte ätherische Öle (0,1 bis 1,0‰), wie Rosen-, Neroli-, Bergamott-, Citronen-, Fenchel- und Terpentinöl, durch die ich der eingefütterten Zuckerlösung einen kräftigen Duft gab, waren im Honig durch den Geruch nicht mehr wahrzunehmen.

Mineralien.

Anorganische Bestandteile, Mineralien (Kalk-, Natron-, Kalisalze), wie auch ungelöste Stoffe (Kohle, Steine) bleiben darin oder sind in Lösung für den Honigmagen diffusionsfähig und werden dann entweder vom Bienenkörper verbraucht oder wie die Jodsalze mit dem Wasser durch den Harn ausgeschieden.

Farbstoffe.

Füttert man Farbstoffe ein, so macht man die Erfahrung, daß diese entweder verschwinden oder doch schwinden und nur in geringerer Menge im Honig vorhanden sind, wenn man seinen Konzentrationsgrad berücksichtigt, oder daß sie eine andere Nuance angenommen haben. Zum Teil bewirkt der Honigmagen die Resorption, zum Teil wird der Farbstoff durch den vorhandenen Gerbstoff niedergeschlagen, oder durch den sauren Zungenspeichel verändert.

Füttert man Invertzucker oder Kunsthonig ein, der die Fiehesche bzw. meine Reaktion[1]) kräftig gibt, so ist der daraus gebildete Honig frei von dieser Reaktion.

Auf der anderen Seite sind Stoffe in den Honig gelangt, die in dem Nectar oder in dem reinen eingefütterten Zuckerwasser nicht vorhanden waren:

[1]) Prakt. Wegweiser f. Bienenzüchter 1908, Heft 24.

Invertase.

Unter den Fermenten ist es in erster Linie die Invertase des Honigs, ein Eiweißkörper, von dem Langer[1]) nachgewiesen hat, daß er tierischen Ursprungs ist, da er die Raffinose nicht spaltet und Bienengift zerstört. Da aber diese Folgerung nur dann richtig ist, wenn sowohl die Phytoinvertasen, wie auch die Zooinvertasen je untereinander gleich sind, so ging ich bei der Nachprüfung der Langerschen Angaben noch einen Schritt weiter und nahm auch statt des Bienenbrots, das erst durch den Bienenspeichel nach Langer das Invertaseferment erhalten soll, den reinen Pollen, besonders da die Zufuhr von Speichel beim Sammeln des Pollens sehr gering ist und Proteine neben Invertzucker in den Pollenarten, die von der Biene gesammelt werden, in großer Menge in dem Spermatoplasma vorhanden sind.

Ich sammelte mir möglichst reinen Pollen von Helianthus annuus und Impatiens glanduligera. Besonders letzteren kann man nach dem Zurückklappen des Sporns sehr leicht und rein in ein darunter gehaltenes Gefäß abstreichen. Bei sorgfältiger Arbeit mit sterilisierten Utensilien erhält man einen für den Versuch meist genügend reinen Pollen, so daß man auf einen Zusatz von konservierenden Mitteln (wie Fluornatrium usw.) verzichten kann.

Der Pollen wurde mit einer sterilisierten Rohrzuckerlösung, die im Polarisationsapparat nach Mitscherlich eine Ablenkung von $+7{,}2^0$ gab, also $5{,}4\%$ Rohrzucker enthielt, geschüttelt und in den Brutschrank gestellt.

Die Wirkung war überraschend. Schon nach kurzer Zeit war die Ablenkung schwächer und verhielt sich im 2 dm-Rohr wie folgt:

	Nach 24 Stdn.	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
Rohrzuckerlösung. 5,4% Zuckergehalt pol. +7,2 . .	+7,2°	+7,2°	+7,2°	+7,2°
Pollen von Impatiens glanduligera. 0,1 g auf 100 g obiger Zuckerlösung	+3,5°	+1,0°	−0,2°	−0,2°
0,1 g auf 75 g obiger Zuckerlösung	+3,5°	—	−0,5°	−2,0°
0,2 g auf 50 g obiger Zuckerlösung	+2,0°	+0°	−1,0°	−2,0°

[1]) Arch. f. Hygiene 71, 316.

Zuerst geht die Umsetzung der Hauptmenge schnell vor sich und ist wohl an die Menge des Phytospermatoplasmas und auch an die Güte des Pollens (unreifer Pollen enthält Stärke) und an die Temperatur gebunden, während die letzten paar Prozente Rohrzucker sehr langsam umgesetzt werden. Zoospermatoplasma (Katze) invertiert Rohrzucker nicht.

Durch diesen Versuch ist der direkte Beweis erbracht, daß der Pollen selbst die nativen Eigenschaften der Invertase enthält und der Speichel im Bienenbrot diese Wirkung nicht erhöht resp. der Bienenspeichel nicht erst die Invertase in das Bienenbrot hineinbringt.

Durch die weitere serologische Eiweißdifferenzierung Langers ist nun bewiesen, daß diese Invertase derselbe Eiweißkörper ist, wie er im Honig, im Futtersaft und im Körper der Larven und der ausgebildeten Biene vorhanden ist.

Die Honiginvertase ist also nicht arteigenes Sekret der Honigbiene, sondern wird von Pflanzen im Spermatoplasma des Pollens gebildet und kommt aus dem Pollenmagen der Biene durch den Verschlußkopf in den Honigmagen und wird in diesem dem aufgenommenen Nectar einverleibt. Mit diesem Eiweißkörper gelangen noch, wie wir später sehen werden, andere Körper aus dem Pollenmagen in den Honig, die auch dem Pollen entstammen.

Diastase.

Diastaseferment ist im Honig auch in geringen Mengen vorhanden und bewirkt die Umwandlung von etwa vorhandener Stärke in Dextrin. Animalische Diastase ist regelmäßig im Speichel vorhanden, und um nachzuweisen, ob die Diastase ebenfalls von dem Pollen durch das Spermatoplasma in den Honig kommt oder von der Biene aus dem Zungenspeichel herrührt, michte ich der oben erwähnten Pollenaufschwemmung 1 ccm eines 1%igen Stärkekleisters hinzu und erwärmte unter Umschütteln 1 Stunde auf 45° C. Auch bei längerem Stehen wurde die Stärke nicht umgewandelt und gab mit Jodjodkaliumlösung noch die blaue Stärkereaktion, so daß die Diastasewirkung wohl auf den Bienenspeichel zurückzuführen ist.

Um den Einfluß des Bienenspeichels resp. die Sekretion des Honigmagens und die Absorption des letzteren kennen zu lernen, fütterte ich Jodstärke in größeren Mengen ein.

20 g Weizenstärke wird mit 200 g Wasser zu Kleister verkocht, 1 g Jod mit 2 g Jodkalium in 10 g Wasser gelöst, hinzugesetzt und mit Rohrzuckerlösung 3:5 zum Liter aufgefüllt. Diese dicke, blauschwarze Flüssigkeit nahmen die Bienen über Nacht auf. Der hiervon in den Zellen abgeschiedene Honig hatte aber eine ganz andere Farbe, war nicht wie die Zuckerlösung blauschwarz, sondern ganz hell rosaviolett geworden, in manchen Zellen noch heller, fast farblos. Er enthielt zwar schon Dextrin aber auch noch etwas Stärke, und das Jod war bis auf eine minimale Spur verschwunden. Vor dem Flugloch, gerade in der Richtung, in der die Bienen während der Nacht und am folgenden Tage das Jodfutter kräftig abdunsteten, hatte ich ein Stück sehr empfindliches Chlorzinkstärkepapier aufgehängt, um zu erfahren, ob das freie Jod mit dem Wasser verflüchtigt wurde. Letzteres geschah nicht, aber ich fand das Jod gebunden in den sehr flüssigen Faeces wieder, die die Bienen unnormalerweise in großen Mengen beim Abfegen der Waben abgaben, was sonst in dem Maße nie geschieht.

Das Jod hatte also mit dem Wasser den Weg aus dem Honigmagen ins Blut und durch die Malpighischen Gefäße zurück in den Dünndarm und Mastdarm in 24 Stunden gemacht.

Trotz der Anwesenheit von Jod war die Diastase des Zungenspeichels oder des Magensekrets in Aktion getreten und hat die Stärke zum großen Teil in Dextrin verwandelt.

Katalase, Oxydase, Peroxydase, Reduktase.

10 ccm frischer Honiglösung 1:2 werden mit 10 ccm 1%iger Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt. Hierbei geben die echten Honige als Katalasewirkung im Einhornschen Saccharimeter bei gewöhnlicher Temperatur eine Abscheidung von 1 bis 5 ccm Sauerstoff.[1]) Ob die Katalasewirkung auf einen der vorhergehenden oder auf einen neuen Körper zurückzuführen ist, ist noch nicht ermittelt.

Durch die Oxydase-, Peroxydase- und Reduktasereaktion[2]) (Paraphenylendiamin und Wasserstoffsuperoxyd) sollen Honige von erhitzten Honigen unterschieden werden.

---

[1]) August Anzinger, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 19, Heft 2 und 7.

[2]) Ph. Z. 48, 1010, 1903.

Diese Reaktion hat sich als einfache chemische herausgestellt, die durch Fructose hervorgerufen wird.[1])

Fermente können auch leicht durch Hefen und Bakterien in den Honig kommen, da er gern Wasser aus der Luft anzieht und in der dadurch dünnflüssigen Oberflächenschicht sofort gärt. Auch echter, reiner und reinlich gesammelter, fest krystallisierter Honig, von bester Beschaffenheit, macht bei mehrjähriger Aufbewahrung bisweilen eine Art stille Gärung durch, die nur daran zu erkennen ist, daß eine fingerbreite, meist horizontale Fläche, die langsam von oben nach unten steigt, durch feine ausgeschiedene Luftbläschen etwas heller aussieht.

Freie Fettsäuren.

In jedem echten Honig ist stets außer Wachspartikelchen eine geringe Menge freier Fettsäuren (Schweißgeruch des Biens, Stockgeruch) vorhanden, die dem Honig aus Brutwaben einen vorwaltenden Geruch und unangenehmen Geschmack verleihen können. Wiewohl auch jede Biene und Larve an der Oberfläche ihres Körpers von diesen freien Fettsäuren überzogen ist, die ihnen auch einen eigenartigen Geruch verleihen, so entwickeln sich dieselben hauptsächlich bei der Häutung und durchtränken die in der Zelle zurückbleibende Nymphenhaut, so daß die Brutzellen im Innern wie gewichst erscheinen. Nachträglich in diesen Brutzellen abgelagerter Honig nimmt jenen faden Geruch und Geschmack der freien Fettsäuren an.

Freie Ameisensäure.

Aus dem Bienengift, das beim Stechen aus der Giftblase durch den Stachel in die Wunde gebracht wird und die bekannten Erscheinungen hervorbringt, verflüchtigt sich die Ameisensäure nicht frei, sondern als Ester und wird erst durch Zersetzung desselben frei und weniger flüchtig. Die Bienen geben außer beim Stich das Bienengift in kleinen Tröpfchen selbsttätig ab, besonders wenn sie gereizt sind, so daß der flüchtige Ameisensäureester die ganze Wohnung durchzieht und oft genug zur Erstickung des Biens beiträgt. Erfahrungsgemäß ist freie Ameisensäure in größerer Menge in recht alten Brutwaben anzutreffen und gelangt aus diesen in den Honig, während junger

[1]) Siehe Fußnote 1 S. 250.

Bau und der darin befindliche Honig frei von Ameisensäure ist. Der Gehalt des Honigs an Ameisensäure wie auch an freien Fettsäuren kann beim Genuß ein Kratzen im Halse bedingen.

Aromatische Körper.

Wie ich oben bei der Invertase schon darauf hingewiesen habe, geht mit derselben aus dem Pollenmagen der Biene ein zweiter Körper mit in den Honig über, der ebenfalls vom Pollen stammt. Dieser einfache Körper ist ein Benzolderivat und bedingt den spezifischen Geruch und Geschmack des Honigs. Die genaue Charakterisierung dieses Körpers behalte ich mir vor.

Zucker (Invertzucker), fettes Öl, Phosphate und Kalksalze

gehen außerdem als Bestandteile des Spermatoplasmas des Pollens mit der Milch aus dem Pollenmagen in den Honig über.

Es geschieht das Pollensammeln des Biens also nicht allein zur Bruternährung, sondern auch zur Honigbereitung.

Wenn der Honig fertig in Pflanzen vorkäme und nicht erst durch die Bienen zum Honig gemacht würde, dann wären die Imker mit ihren Bienen recht überflüssig.

Aus der Pflanzenwelt die Süßstoffe zu gewinnen, bemühte man sich schon seit alters her, und daß es trefflich gelungen ist, beweist der niedrige Zuckerpreis und die Reinheit, in der dieses natürliche Pflanzenprodukt isoliert wird.

Den Bienen hat also der Mensch in dieser Richtung schon den Rang abgelaufen; aber alle diese Produkte, die er in größter Reinheit (Rohrzucker) oder mit den natürlichen Verunreinigungen (Manna, Pflanzensäfte) isoliert und sammelt und noch aus den verschiedensten Cambialsäften durch Anbohren der Stämme sammeln oder durch Züchtung von Gallentieren und ausgiebigeren Nectarien erhalten kann, würde ihn nicht einen Schritt weiter bringen. Er erhält immer nur Zucker und sogar die verschiedensten Kohlenhydrate, wie in der Manna Mannit und Dulcit, aber keinen Honig.

Die Biene dagegen wandelt alle diese Stoffe in Honig um.

Sie also ist es, die den Honig liefert, nicht aber bringen die Pflanzen den Honig hervor, und die Biene ist nicht nur die Sammlerin, wie jetzt wieder behauptet wird.[1])

Die Biene fabriziert aus den eingetragenen Stoffen Honig. Die Hauptmasse des Honigs ist stets der Zucker des Nectars, dem die Biene eine ziemlich gleichmäßige Menge Milch aus dem Pollenmagen hinzusetzt. Beim künstlichen Füttern im Stock, besonders in großen Mengen hintereinander, ebenso bei jedem Umtragen des Honigs im Stock geht diese Milch in kleineren Mengen aus der Biene in den Honig über, während die mit Anstrengung und Mühe aus der Natur eingetragenen Nectartröpfchen bei meinen Untersuchungen stets einen größeren Gehalt an diesen Stoffen im Honig erkennen ließen, der sich beim Umtragen steigert.

Aus der Rohrzuckerlösung des Nectars bildet die Biene mit Hilfe der Invertase Invertzucker, dem durch den aromatischen Körper der Honiggeschmack und -geruch gegeben ist, während die Diastase nicht immer zur Geltung kommt. Durch alle übrigen Nebenbestandteile des Nectars, die aber fehlen können, ergeben sich die verschiedenen Honige.

Vom Standpunkte des Chemikers müssen wir also von dem Honig ausgehen, der von der Biene aus reinstem Zucker hergestellt ist, und können durch die Nebenbestandteile die einzelnen Honige zu bestimmen suchen, die wie oben gesagt bei den einzelnen Honigen wechseln und gänzlich fehlen können und nur bei bestimmten Honigen vorhanden sind, so daß chemisch z. B. zwischen Heidehonig und Akazienhonig ein viel größerer Unterschied ist als zwischen diesem und dem Fütterungsprodukt.

In dem Heidehonig habe ich vor einigen Jahren einen Körper, das Viscin[2]), gefunden, durch dessen Vorhandensein die zähe Konsistenz des Heidehonigs und der Unterschied von sämtlichen anderen Honigen bedingt wird.

Vom Standpunkte des Feinschmeckers, wie auch von dem des Imkers müssen wir den Honig vorziehen, der einen vorzüglichen Geschmack mit einem schönen Aussehen verbindet und der nicht durch Zuckerfütterung entstanden ist.

[1]) Deutsche Bienenzucht in Theorie und Praxis 1909, Heft 10.

[2]) Vgl. Deutsche Bienenzucht in Theorie u. Praxis, Jahrg. 17, Nr. 9.

Wenn auch der Wert des Honigs hauptsächlich im Geschmack liegt, so kann er doch durch schönes Aussehen oder durch hervorragende Heilwirkungen erhöht werden. Alle diese Vorzüge, die auch zu Nachteilen werden können, sind durch Nebenbestandteile bedingt. Den Hauptunterschied unter den Honigen machen die Riechstoffe der Pflanzen, wenn solche vorhanden sind, und die Gerbstoffe, die die hellere oder dunklere Farbe des Honigs bedingen, während größere Anhäufung von anderen Nebenbestandteilen im Honig Spezialhonige, z. B. Heidehonig durch den Viscingehalt, Tannhonig durch den Dextringehalt, entstehen lassen.

Den Hauptunterschied bedingen im Honig also die Nectarquellen und erst in zweiter Linie die Beschaffenheit der Waben, ob Brut- oder Honigwaben, aus denen der Honig gewonnen wird. Die Biene prägt aber allem eingetragenen Nectar erst das Honigsiegel dadurch auf, daß sie aus ihrem Körper den einzelnen Honigen ziemlich gleichmäßige Mengen an Würze und Fermenten hinzusetzt, die Honige eindickt und in Wachszellen einschließt.

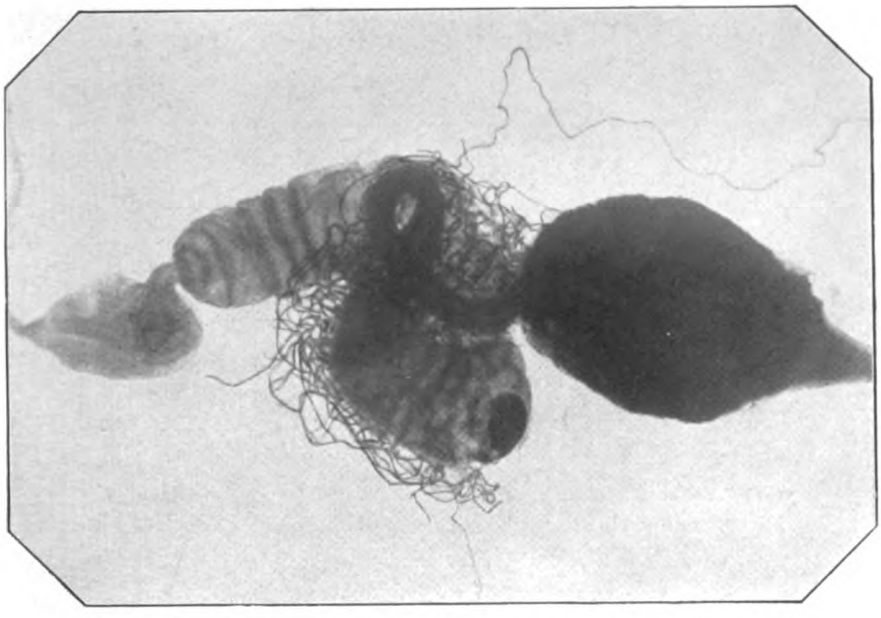


Fig. 1. Verdauungsweg der Biene. Nach einer Mikrophotographie. Vergrößert $12^1/_4$ linear.

Über das Tetrodongift.

Von

Y. Tahara.

(Aus dem Kaiserlichen chemisch-hygienischen Laboratorium zu Tokio.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1910.)

Japan ist besonders reich an giftigen Tetrodonarten, Igelfischen, die fast überall im umgebenden Meer vorkommen. Da das Gift ausschließlich im Eierstock sich anhäuft, das Fleisch aber ungiftig ist und sich außerdem durch einen schönen Geschmack auszeichnet, so wird der Fisch nach sorgfältiger Entfernung der Eingeweide mit großer Vorliebe bei der weniger gebildeten Volksklasse gegessen.

Es liegt bisher keine ausführliche Untersuchung in bezug auf den giftigen Bestandteil des Tetrodons vor. Über die Giftigkeit der Fische haben schon einige Forscher kurz berichtet. Die ersten systematischen Untersuchungen über das Tetrodongift verdanken wir den beiden japanischen Forschern Prof. Dr. J. Takahashi und Prof. Dr. Y. Inoko. Ihre Forschung hat hauptsächlich die Frage über die Verteilung des Giftes in den einzelnen Organen des Tetrodons, über die giftige und ungiftige Species, ferner die Wirkungsweise des Giftes in den wesentlichen Punkten aufgeklärt. Es ist ihnen jedoch nicht gelungen, das Gift aus der Lösung zu isolieren und chemisch genauer zu studieren.

Aus allen diesen Gründen beanspruchen daher die chemischen Untersuchungen des Tetrodongiftes ein hohes Interesse.

Die Darstellung des Tetrodongiftes wurde früher in folgender Weise von mir vorgenommen:

Man zerkleinert zunächst die Rogen, verdünnt sie mit Wasser zu einem Brei und trennt krystallinische Substanzen anorganischer oder organischer Natur durch Dialyse von amorphen Eiweißstoffen.

Aus dem Dialysate wird Phosphorsäure nebst anderen Verunreinigungen durch Bleiessig entfernt, das Filtrat nach Entbleien mittels Schwefelwasserstoff durch Verdampfen eingeengt, zu der eingeengten Flüssigkeit Alkohol zugesetzt, wobei rohe Giftstoffe mit den etwa vorhandenen krystallinischen organischen Substanzen sich ausscheiden.

Zur Reinigung der rohen Giftstoffe behandelt man den Niederschlag mit wenig kaltem Wasser, filtriert den ungelöst gebliebenen, ungiftigen Anteil von dem gelösten ab und entfernt dann das dem Gift etwa anhaftende Chlor mittels Silberhydroxyd. Beim Ansäuren des Filtrates mit verdünnter Essigsäure scheidet sich nun ein weißer, krystallinischer Niederschlag ab, die Verbindung des Tetrodongiftes mit dem Silber, die nach Filtrieren und Waschen mit Wasser mittels Schwefelwasserstoff vom Silber zu befreien ist. Hiernach versetzt man die vom Silbersulfid getrennte und dann eingedampfte Lösung mit absolutem Alkohol oder Äther, um die Fällung des Tetrodongiftes zu erzielen.

Das auf diese Weise erhaltene Tetrodongift bildet eine weiße, harzartige Masse und wurde wegen seines sauren Charakters vom Verfasser Tetrodonsäure genannt.

In der von dem krystallinischen tetrodonsauren Silber abfiltrierten Mutterlauge bleibt der zweite Giftstoff „Tetrodonin" in Lösung und wird durch Behandlung dieser Lösung mit Schwefelwasserstoff und nachherigen Zusatz von absolutem Alkohol in Form weißer, feinnadeliger Krystalle erhalten.

Neues verbessertes Verfahren zur Darstellung des Tetrodongiftes.

Man wäscht die Eierstöcke zur Entfernung der ihnen anhaftenden Verunreinigungen und der anorganischen Salze, vorwiegend Kochsalz, wiederholt mit Wasser, bis das Waschwasser durch Silberlösung nur eine schwache Trübung zeigt, schabt die Rogenmasse mit dem Wasser aus der umhüllenden Membran heraus und zermahlt dieselbe mittels eines japanischen Mahlsteins unter Zusatz von etwas Wasser. Der nunmehr mit der ca. 2fachen Menge destillierten Wassers angerührte Rogenbrei wird ca. 3 Stunden auf dem Dampfbade erwärmt, darauf durch einen Spitzbeutel filtriert, der Rückstand noch 2mal mit Wasser auf dem Dampfbade ausgezogen und in gleicher Weise wie vorher behandelt. Die gesamten Auszüge werden nach Ansäuern mit Essigsäure auf dem Dampfbade eingeengt, wobei sich die Eiweißstoffe größtenteils in koaguliertem Zustande abscheiden und abfiltriert werden. Das von koaguliertem Eiweiß befreite Filtrat verdampft man noch weiter, bis das spezifische Gewicht ca. 1,04 bis 1,05 beträgt, was durch Verdampfen bis

auf $^1/_4$ des ursprünglichen Volumens erreicht wird, und versetzt nach Erkalten die filtrierte Lösung unter Zusatz von verdünnter Essigsäure mit konzentrierter Bleizuckerlösung (1:5), wobei Phosphorsäure und andere Verunreinigungen, besonders Chlorblei, in reichlicher Menge ausfallen.

Beim Hinzufügen von Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion (man trage dabei dafür Sorge, daß der Gehalt an freiem Ammoniak in der Flüssigkeit nicht ca. 0,34% überschreitet, damit das alkaliempfindliche, giftige Prinzip keine Zersetzung erleidet) scheidet sich nun erst das Tetrodongift mit Bleihydroxyd, wahrscheinlich als eine schwer lösliche Bleiverbindung, ab. Dieser Giftniederschlag wird auf einer Nutsche gesammelt, unter Anwendung einer gut wirkenden Wasserstrahlpumpe filtriert und mit dem Ammoniak enthaltenden Wasser gut gewaschen.

Nachdem der Niederschlag vom Wasser möglichst gut befreit worden ist, breitet man denselben auf einer frisch geglühten Tonplatte in dünner Schicht aus, wodurch der Niederschlag nach einiger Zeit genügend trocken wird, so daß er leicht von der Platte abgekratzt werden kann. Man rührt den so getrockneten Giftniederschlag in einem Mörser mit einer geringen Menge von 0,34% ammoniakhaltigem Wasser fleißig um; damit man den Niederschlag möglichst vollständig waschen kann, setzt man demselben unter Umrühren noch eine genügende Menge Wasser zu und läßt ihn in einem hohen Glaszylinder (von 100 cm Höhe und 15 cm Durchmesser) absetzen.

Man hebert den oben stehenden, klaren Anteil vom Waschwasser ab, setzt noch Wasser hinzu und dekantiert wie vorher. Diese Operation ist so oft zu wiederholen, bis das Waschwasser nicht mehr die Chlorreaktion zeigt, was in den meisten Fällen mit 4 bis 5maligem Wiederholen erreicht wird. Zum letztenmal wiederholt man das Waschen mit dem ammoniakfreien Wasser, filtriert den Niederschlag und behandelt in gleicher Weise wie vorher. Zur Gewinnung des Giftes wird der noch ziemlich feuchte Niederschlag durch anhaltendes, kräftiges Umrühren in einer passenden Menge Wasser verteilt und durch Einleiten eines kräftigen Schwefelwasserstoffstromes vollständig zerlegt, bis die weißlichen Flocken des Giftniederschlages ganz verschwinden.

Durch Erwärmen auf dem Wasserbade bei einer Temperatur unter 60° wird der Überschuß von Schwefelwassertoff entfernt und nunmehr vom gebildeten Schwefelblei abfiltriert. Das klare, schwach gelblich gefärbte Filtrat verdampft man unter vermindertem Druck bei einer Temperatur unter 60° auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz.

Aus dieser sirupdicken Lösung wird das rohe Gift durch Zusatz von absolutem Alkohol als ein brauner oder gelblichweißer Niederschlag gefällt, der abfiltriert, mit wenig absolutem Alkohol gewaschen und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet werden muß.

Diese Manipulation hat man möglichst schnell auszuführen, weil das Gift außerordentlich stark hygroskopisch ist. Das auf diese Weise erhaltene Gift nenne ich der Kürze halber „Gift A". Das Tetrodongift wird bei der beschriebenen Operation aus der wässerigen Lösung durch absoluten Alkohol nicht vollständig gefällt, sondern es bleibt vielmehr in reichlicher Menge und in reinerem Zustande noch als das „Gift A" ein zweiter Stoff in Lösung. Verdampft man nämlich die vom „Gift A" abfiltrierte Lösung im Vakuum bei niedriger Temperatur zur Trockne, so bleibt eine braun gefärbte, harzartige Substanz zurück, die ich „Gift B" nenne und beim Tierversuch als stark giftig kennen gelernt habe. Die auf diese Weise gewonnenen Substanzen „Gift A" und „Gift B" wurden nach folgendem Verfahren gereinigt:

1. Reinigung des durch Alkohol niedergeschlagenen „Giftes A". 50 g von dem „Gift A" wurden in 100 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 1 l absolutem Alkohol versetzt, wobei eine weißliche Fällung entstand, die bald abfiltriert wurde. Nach Zusatz von 600 ccm Äther und nach Stehen über Nacht wurde aus dem Filtrat noch ein gifthaltiger Niederschlag erhalten. Nach Verjagen von dem anhaftenden Äther und Alkohol und Trocknen wog derselbe ca. 11,5 g. Die Giftigkeit wurde bei einigen Mäusen durch subcutane Injektion geprüft.

Die dabei beobachteten Symptome stimmen mit den Ergebnissen der früheren Forscher überein. Im Anfange tritt eine Unruhe ein; es entsteht allmählich Parese der hinteren Extremitäten, der Gang wird unsicher und taumelnd und die Parese erstreckt sich dann auf die vorderen Beine, so daß der

Gang ganz schwer wird. Stöhnende Atmung beginnt, endlich Krämpfe und Tod.

Ich bezeichne das Gift, das in äther-alkoholischer Lösung zurückblieb und durch Verdampfen erhalten wurde, mit „Gift A_L" und das Gift, das damit gefällt wurde, mit „Gift A_F".

Tierversuche (Maus).

Nr.	Gift	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tod Min.
1	Gift A_L	10,2	1,0	5,5
2	„ „	11,5	0,5	6,5
3	Gift A_F	14,5	2,0	9,0
4	„ „	11,9	1,0	10,0

Der Niederschlag „Gift A_F", der im Tierversuch sich weniger giftig erwies, wurde nochmals nach demselben Verfahren behandelt, indem derselbe in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Äther-Alkohol gefällt und in zwei Komponenten, d. h. in einen durch Äther-Alkohol fällbaren Teil („Gift I") und in einen durch Äther-Alkohol nicht fällbaren Teil („Gift II") getrennt wurde. Der Niederschlag „Gift I" wurde ebenfalls nach obiger Behandlung in den durch Äther-Alkohol nicht fällbaren Teil („Gift I_1") und in den dadurch fällbaren Teil („Gift II_1") geteilt. Die Giftigkeit der vier Giftfraktionen wurde durch Versuche an Mäusen annähernd kontrolliert, wobei sich folgende Resultate ergaben:

Tierversuche.

Nr.	Gift	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tod Min.
1	Gift II	10,2	1,0	2,5
2	„ „	10,1	0,5	3,0
3	„ „	10,6	0,5	2,5
4	„ „	9,2	0,1	6,0
5	Gift I (Niederschlag)	10,0	2,0	16,5
6	Gift I (Niederschlag)	8,0	1,0	16,0
7	Gift I_1	12,7	0,5	5,5
8	Gift II_1 (Niederschlag)	—	2,0	Das Tier blieb ganz gesund
9	Gift II_1 (Niederschlag)	—	3,0	Das Tier blieb ganz gesund

Dadurch ist nachgewiesen, daß das Gift bei dieser Behandlung allmählich und fast vollständig in die Äther-Alkohol-Gemische übergegangen ist.

Das „Gift A_L" wurde nach dem Prinzip der Bleifällung in folgender Weise nochmals gereinigt:

Man löst das Gift in Wasser, versetzt die Lösung mit Bleizuckerlösung und filtriert den dabei in geringer Menge entstandenen Niederschlag ab. Setzt man dem Filtrat wenig Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion zu, so fällt das Gift mit Bleihydroxyd gemengt als ein weißer, flockiger Niederschlag aus. Dieser Giftniederschlag wird filtriert, zuerst mit ammoniakhaltigem Wasser, später mit Alkohol, endlich mit Äther gut gewaschen und sodann mit einer geringen Menge Wasser in ein Becherglas gespült. Nach schwachem Ansäuern mit verdünnter Essigsäure leitet man Schwefelwasserstoff in das Becherglas ein, das den Niederschlag in möglichst feiner Suspension enthält. Setzt man der vom Schwefelblei abfiltrierten und bei niedriger Temperatur unter 70° zur Sirupkonsistenz eingedampften Lösung einen Überschuß von Alkohol und Äther hinzu, so scheidet sich das Gift in einem reineren Zustande als das ursprüngliche ab. Nachdem der Niederschlag mit Äther-Alkohol gewaschen ist, trocknet man denselben im Exsiccator über Schwefelsäure. Beim Zerreiben nach völligem Trocknen stellt die Substanz ein weißes, amorphes Pulver dar. Ich bezeichne diese Substanz als „Präparat Nr. I".

Tierversuche (Maus).

Nr.	Gift	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tod Min.
1	Präparat Nr. I	11,4	0,5	4,0
2	„ „ „	13,9	0,1	15,0

Reinigung des im Alkohol zurückgebliebenen „Giftes B".

Man löst das Gift in wenig Wasser auf, filtriert von etwa zurückbleibendem Rückstande ab, fällt aus dem Filtrat das Gift durch Zusatz von Äther-Alkohol, löst dasselbe wiederum in wenig Wasser und läßt unter Zusatz von etwas Tierkohle über Nacht stehen. Hierauf befreit man die Lösung von der Tierkohle, setzt dem Filtrat Alkohol so weit hinzu, bis eine Fällung zu entstehen anfängt, filtriert nochmals, setzt dem Filtrat Äther-Alkohol hinzu und läßt über Nacht stehen, wobei sich eine schwach gelblich gefärbte, harzartige Substanz abscheidet. Sodann gießt man die oben stehende, klare Flüssigkeit ab. Trocknet man nunmehr die vom Wasser möglichst befreite Substanz im Vakuum, indem man dieselbe auf einer flachen Schale in dünner Schicht ausbreitet, so bläht sich die Substanz allmählich stark auf und läßt sich nach vollständigem Trocknen leicht pulverisieren.

Das gewonnene Gift bildet nun ein gelblich-weißes, amorphes Pulver (Präparat Nr. II).

Tierversuche (Maus).

Nr.	Gift	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tod Min.
1	Präparat Nr. II	11,7	1,0	1,0
2	„ „ „	10,4	0,5	5,5

Nach demselben Verfahren wurden aus den anderen Untersuchungsmaterialien noch 3 Präparate, Nr. III bis Nr. V, gewonnen, mit denen die Tierversuche an Mäusen ausgeführt wurden. Es sei bemerkt, daß nur bei der Reinigung von Präparat Nr. V nicht Tierkohle angewendet wurde.

Tierversuche (Maus).

Nr.	Gift	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tod Min.
1	Präparat Nr. III	11,1	1,0	1,0
2	„ „ „	14,5	0,5	5,0—5,5
3	„ „ „	11,1	0,5	7,0
4	Präparat Nr. IV	13,4	1,0	3,5
5	„ „ „	10,0	1,0	9,0
6	„ „ „	15,1	0,5	5,0—5,5
7	Präparat Nr. V	10,2	1,0	2,5
8	„ „ „	10,1	0,5	3,0
9	„ „ „	9,2	0,1	6,0
10	„ „ „	10,6	0,5	2,5

Die zur Darstellung von Tetrodongift angewandte Spezies war hauptsächlich Tetrodon porphyreus Sieb., dem auch Tetrodon vermicularis Sieb. in geringer Menge beigemengt war.

Zur Darstellung des Tetrodongiftes wurden, in frischem Zustande und in 5 Portionen geteilt, mehr als 1400 Eierstöcke verarbeitet, die von Anfang Februar bis Ende März in der Umgegend von Tokio gesammelt waren. Das Laichen findet in Japan in dieser Zeitperiode statt.

Die Darstellung des Giftes in großem Maßstabe ist in einem kleineren Laboratorium deswegen mit den größten Schwierigkeiten verbunden, weil die dazu erforderliche enorme Menge Eierstöcke zur Vermeidung der Fäulnis möglichst rasch verarbeitet werden muß, da eine lange Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials in den meisten Fällen, selbst in kalter Winterzeit, fast unmöglich ist.

Die Giftpräparate, die bei den einzelnen Manipulationen nach demselben Verfahren gewonnen wurden, zeigten sowohl in der Giftigkeit wie in der Elementarzusammensetzung eine nicht unbedeutende Abweichung, so daß man diese Präparate noch nicht als chemisch definierbare, einheitliche Substanzen betrachten kann.

Im folgenden werde ich eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der Tierversuche und der Elementaranalysen von den auf obige Weise gewonnenen Präparaten folgen lassen:

Tierversuche.

Nr.	Giftpräparat	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit bis zum Tod Min.	Giftmenge pro 1 g Körpergewicht g
1	Nr. I	11,4	0,5	4,0	0,044
2	„ „	13,9	0,1	15,0	0,0072
3	Nr. II	11,7	1,0	1,0	0,085
4	„ „	10,4	0,5	5,5	0,048
5	Nr. III	11,1	1,0	1,0	0,090
6	„ „	14,5	0,5	5,0—5,5	0,035
7	„ „	11,1	0,5	7,0	0,045
8	Nr. IV	13,4	1,0	3,5	0,075
9	„ „	10,5	1,0	9,0	0,095
10	„ „	15,1	0,5	5,0—5,5	0,033
11	Nr. V	10,2	1,0	2,5	0,098
12	„ „	10,1	0,5	3,0	0,050
13	„ „	10,6	0,5	2,5	0,047
14	„ „	9,2	0,1	6,0	0,009

Selbstverständlich ist es unmöglich, durch diese Tierversuche die Giftigkeit der einzelnen Präparate miteinander zu vergleichen, da die angegebenen Mengen der Gifte nicht minimale letale Dosen sind. Nur die minimale letale Dosis des „Giftes Nr. III“ für Kaninchen wurde durch einige Versuche bei subcutaner Applikation annähernd bestimmt; sie ergab sich zu 3 bis 4 mg pro 1 kg Körpergewicht.

Elementaranalyse.

Bei der Analyse wurden jedesmal 0,2 bis 0,3 g von den bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanzen (Präparat Nr. I bis Nr. V) in üblicher Weise mit Kupferoxyd und Sauerstoff verbrannt:

Nr.		Nr. I	Nr. II	Nr. III	Nr. IV	Nr. V	Mittel
1	C	41,37	41,98	41,06	—	—	41,47
2	H	6,74	7,21	7,21	—	—	6,93
3	N	4,44	3,53	2,97	2,88	4,55	3,67

Die Substanz läßt sich sehr schwer verbrennen. Sie bläht sich beim Erhitzen stark auf.

Bei diesen Analysenresultaten ist besonders bemerkenswert, daß jedes Präparat in seinem Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalte keine bedeutende Abweichung, im Stickstoffgehalte dagegen eine große Schwankung zeigt, die im Maximum 1,67% beträgt. Daraus geht hervor, daß diese Präparate noch nicht rein genug sind, als daß aus diesen Zahlen eine empirische Formel aufgestellt werden kann. Setzt man dennoch voraus, daß das Tetrodongift die Elementarzusammensetzung besitzt, die dem Durchschnitt der mit den 5 Präparaten erhaltenen Analysenzahlen entspricht, so ergibt sich folgendes Resultat:

	Gefunden:	Ber. für $C_{13}H_{29}NO_{12}$:	Ber. für $C_{13}H_{27}NO_{12}$:
C	41,47	41,69	41,90
H	6,93	7,20	6,73
N	3,67	3,47	3,49

Die amorphe, stark wirkende Substanz, die ich unter dem Namen „Tetrodonsäure" im Jahre 1894 in der Zeitschr. d. japan. pharmaz. Gesellsch. 14 beschrieben habe, ist mit diesem Gift identisch.

Bei meiner ersten vorläufigen Mitteilung habe ich dieser Substanz nur deswegen den Namen „Tetrodonsäure" gegeben, weil dieselbe eine salzartige Metallverbindung liefert. Da ich mich jedoch überzeugt habe, daß die Substanz keine ausgeprägte Säurenatur besitzt, so daß die Nomenklatur „Tetrodonsäure" im strengen Sinne des Wortes nicht zutrifft, so möchte ich von jetzt ab den Namen „Tetrodonsäure" fallen lassen und an Stelle dessen einen neuen Namen, „Tetrodotoxin", einführen.

Eigenschaften des Tetrodotoxins.

Es scheint das Tetrodotoxin, wie die Analysendaten zeigen, noch nicht ganz rein zu sein. Jedes Präparat (Nr. I bis Nr. V) stellt eine amorphe, harzartige Masse dar, die sich beim Reiben leicht in ein gelblich-weißes Pulver verwandeln läßt. Dieses Pulver ist gänzlich geruch- und geschmacklos, löst sich äußerst leicht in Wasser, schwer in Alkohol, ist aber in absolutem Alkohol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Amylalkohol und allen übrigen organischen Lösungsmitteln ganz unlöslich.

Die Löslichkeit des Tetrodotoxins in Alkohol hängt wesentlich von dem Wassergehalte desselben ab.

Das unreine Tetrodotoxin enthält noch Spuren von Substanz, die durch Goldchloridlösung gefällt wird. Scheidet man diese Verunreinigung ab, so erhält man erst ein reines Tetrodotoxin.

Was die übrigen Eigenschaften anbelangt, so werde ich später im Abschnitt VII Genaueres erwähnen.

Die dem Tetrodotoxin beigemengten ungiftigen Bestandteile.

Es ist darüber kein Zweifel, daß der wässerige Auszug der Eierstöcke außer dem eigentlichen Giftstoff, dem Tetrodotoxin, noch mehrere andere organische Substanzen, insbesondere basische Verbindungen gelöst enthält. Die Kenntnis dieser ungiftigen Substanzen hat auch für das Studium des Giftstoffes eine große Bedeutung, weil sie einerseits uns einen sicheren Anhaltspunkt für die Beurteilung der Reinheit des Giftes bietet und andererseits unentbehrlich ist, um den Zusammenhang zwischen den in Fischrogen schon vorgebildeten, ungiftigen Bestandteilen und den etwa bei der Verarbeitung durch Zersetzung des Giftstoffes entstandenen Produkten aufzuklären.

Da ich bei meinen Untersuchungen nur beabsichtigt habe, die giftigen Bestandteile aus den Eierstöcken rein zu isolieren, habe ich die ungiftigen einstweilen beiseite gelassen, um darauf später zurückzukommen. Ich beschränke mich daher hier an dieser Stelle auf die Beschreibung der zwei neuen Körper, die bei der Reinigung des Tetrodotoxins als Verunreinigungen in unbedeutender Menge gefunden wurden.

Nach den unten zu erwähnenden Untersuchungen hat es sich herausgestellt, daß von diesen beigemengten Bestandteilen der erste eine organische Base und der andere ein Kohlenhydrat ist, und daß deswegen das Tetrodotoxin noch mit diesen beiden Verbindungen verunreinigt sein mußte. Nachdem die Beimengung dieser Verunreinigungen im Tetrodotoxin erkannt worden war, gelang es mir endlich, ein noch stärker giftig wirkendes Tetrodotoxin zu gewinnen.

A. Die basische Substanz.

Setzt man zu der wässerigen Lösung des Tetrodongiftes Bleizuckerlösung und Ammoniak hinzu, so fällt das rohe Tetrodotoxin mit Bleihydroxyd gemengt aus. Versetzt man nunmehr

die durch Schwefelwasserstoff entbleite und alsdann durch Verdampfen stark eingeengte Giftlösung mit einer ziemlich großen Menge absoluten Alkohols, so scheiden sich zunächst Verunreinigungen ab, während das Tetrodotoxin im Filtrat gelöst bleibt. Beim Verdampfen des Filtrates bei der Temperatur unter 60° bleibt eine braun gefärbte, unreine, sirupdicke Substanz zurück, in der außer Tetrodotoxin stets eine andere krystallinische Substanz beigemengt enthalten ist. Diese Beimengung ist in Wasser bei weitem schwerer löslich als das Tetrodotoxin, besonders wenn dieselbe beim längeren Stehen vollständig getrocknet ist; sie ist von basischer Natur. Löst man daher den sirupösen Rückstand in möglichst wenig Wasser auf, filtriert die Lösung von der dabei ungelöst gebliebenen, basischen Substanz mittels Saugvorrichtung ab, löst die letztere in verdünnter Salzsäure, worin sie leicht löslich ist, und verdampft die salzsaure Lösung der Base, so scheidet sich das noch tiefbraun gefärbte, unreine Hydrochlorid krystallinisch ab. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus absolutem Alhohol erhält man gelblich weiße Krystalle. Zur weiteren Reinigung werden diese in kochendem Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle behandelt und alsdann der Krystallisation überlassen, wobei sich nach dem Erkalten farblose Prismen abscheiden.

Die wässerige Lösung dieser Substanz gibt mit Goldchloridlösung ein gelbes Golddoppelsalz, von dem nur der Goldgehalt bestimmt wurde.

0,1130 g des bei 100° getrockneten Golddoppelsalzes gaben beim Glühen 0,0518 g Gold. Also beträgt der Goldgehalt 45,87%.

Es stellte sich heraus, daß es sich hier um eine organische Base handelt. Die durch Zerlegung des Golddoppelsalzes erhaltene freie Base wurde durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Alkohol gereinigt. Die so gereinigte Base wurde zur Analyse verwendet.

Analysen.

1. 0,1995 g Substanz gaben 0,3178 g CO_2 und 0,0596 g H_2O.
   C 43,44%, H 3,35%.
2. 0,1815 g Substanz gaben 0,2897 g CO_2 und 0,0560 g H_2O.
   C 43,53%, H 3,46%.

3. 0,0823 g Substanz gaben bei 24,5° und unter 762,1 mm Druck 31,0 ccm Stickstoff.

N 42,25%.

4. 0,0827 g Substanz gaben bei 26,5° und unter 760,7 mm Druck 31,6 ccm Stickstoff.

N 42,34%.

Übersicht der Analysenergebnisse.

	1	2	3	4	Mittel	Ber. f. $C_{11}H_{11}N_9O_2$
C . .	43,44	43,53	—	—	43,49	43,85
H . .	3,35	3,46	—	—	3,40	3,65
N . .	—	—	42,25	42,34	42,30	41,81

Ich habe diese neue Base „Tetronin" genannt.

Sie zeichnet sich durch ihren großen Stickstoffgehalt aus.

Die freie Base, das Tetronin, stellt farblose prismatische Nadeln ohne Geruch und Geschmack dar, löst sich schwer in kaltem Wasser, in kochendem Wasser dagegen gut, sehr schwer in Alkohol und gar nicht in Äther; sie löst sich aber sehr leicht in Säuren unter Salzbildung auf. Die wässerige Lösung der freien Base bläut rotes Lackmuspapier nicht.

Die Substanz hat die Neigung, aus ihrer Lösung durch Tierkohle absorbiert zu werden. Die gereinigte Base gibt ein reingelbes, krystallinisches Golddoppelsalz, das in kaltem Wasser schwer, in kochendem dagegen leicht löslich ist. Das Golddoppelsalz läßt sich demnach aus kochendem Wasser leicht umkrystallisieren. Es schmilzt bei 236° noch nicht.

Die Base wird aus konzentrierten Lösungen durch Platinchlorid als gelber krystallinischer Niederschlag gefällt, nicht aber durch Pikrinsäure.

B. Die stickstofffreie, krystallinische Substanz.

Läßt man die von Tetronin befreite Lösung im konzentrierten Zustande längere Zeit stehen, so scheiden sich daraus allmählich farblose Krystalle ab, die, aus kochendem Wasser einige Male umkrystallisiert, farblose dicke Prismen darstellen. Diese Substanz enthält keinen Stickstoff. Sie löst sich sehr leicht in Wasser, schwer in Alkohol, kaum in Äther, auch nicht in Eisessig und in absolutem Alkohol in der Kälte, aber ziemlich leicht in der Wärme. Die wässerige Lösung der

Substanz reagiert neutral gegen Lackmus, schmeckt schwach süßlich und schmilzt selbst beim Erhitzen auf 280° nicht. Auf dem Platinblech stark erhitzt, läßt sie reichlich Kohle zurück.

Die Substanz reduziert Fehlingsche Lösung nicht.

Mit der gereinigten Substanz werden sowohl Analysen als auch eine Molekulargrößenbestimmung ausgeführt.

Analysen:

1. 0,1786 g Substanz gaben 0,2582 g CO_2 und 0,1094 g H_2O.
   C 39,43%, H 6,86%.
2. 0,2534 g Substanz gaben 0,3640 g CO_2 und 0,1512 g H_2O.
   C 39,31%, H 6,78%.
3. 0,2625 g Substanz gaben 0,3822 g CO_2 und 0,1663 g H_2O.
   C 39,71%, H 7,10%.

	Gefunden				Ber. f.
	1	2	3	Mittel	$C_5H_{10}O_5$
C . . .	39,43	39,31	39,71	39,51	40,00
H . . .	6,86	6,78	7,10	6,91	6,67

Molekulargrößenbestimmung:

Die Bestimmung wurde unter Anwendung von Wasser als Lösungsmittel nach der kryoskopischen Methode ausgeführt.

0,1945 g Substanz, in 17,39 g Wasser gelöst, brachten 0,17° Gefrierpunktserniedrigung hervor.

	Gefunden:	Berechnet für $C_5H_{10}O_5$:
Mol.-Gew.	124	150

Da die vorliegende Substanz zur Pentosegruppe zu gehören scheint, so möchte ich derselben den Namen „Tetrodopentose" beilegen.

Reinigung des Tetrodotoxins.

Durch die obigen Versuche wurde gezeigt, daß das Tetrodotoxin, mit dem ich sowohl Elementaranalyse als auch Tierversuche ausgeführt habe, noch mit Spuren von der basischen Substanz, Tetronin, verunreinigt war, da diese Verunreinigung nach dem im Abschnitte V beschriebenen Verfahren nicht immer völlig entfernt werden kann.

Zur weiteren Reinigung wird das Tetrodotoxin in wenig Wasser gelöst, die Lösung über Nacht stehen gelassen, alsdan wenn nötig, von der dabei krystallinisch ausgeschiedenen, stick-

stofffreien Substanz Tetrodopentose abgetrennt, und im Filtrat die basischen Substanzen durch Zusatz einer Goldchloridlösung entfernt. Fügt man nun zu der so gereinigten Lösung Äther-Alkohol im Überschuß hinzu, so scheidet sich das Tetrodotoxin in weißen Flocken aus. Dasselbe wird sodann auf dem Filter gesammelt, mit Äther gut gewaschen und sorgfältig im Vakuum getrocknet.

Das auf diese Weise gereinigte Tetrodotoxin stellt ein amorphes Pulver dar, das kaum gefärbt ist.

Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

1. 0,2086 g Substanz gaben 0,2945 g CO_2 und 0,1178 g H_2O.
C 38,50%, H 6,33%.

2. 0,2246 g Substanz gaben 0,3147 g CO_2 und 0,1295 g H_2O.
C 38,21%, H 6,44%.

3. 0,2195 g Substanz gaben bei 24,9° und unter 765,4 mm Druck 5,2 ccm Stickstoff.
N 2,66%.

4. 0,2619 g Substanz gaben bei 20,7° und unter 767,0 mm Druck 6,6 ccm Stickstoff.
N 2,90%.

	Gefunden					Ber. f.
	1	2	3	4	Mittel	$C_{16}H_{13}NO_{16}$
C . .	38,50	38,21	—	—	38,36	38,94
H . .	6,33	6,44	—	—	6,38	6,29
N . .	—	—	2,66	2,90	2,78	2,84

Vergleicht man diese Resultate mit denjenigen der vor der Reinigung ausgeführten Bestimmungen, so ist in der Tat die Verschiedenheit auffallend groß. Der Unterschied beträgt bei dem Kohlenstoffgehalt sogar mehr als 3% und bei dem Stickstoffgehalt ca. 1%, während die Wasserstoffbestimmungen unter sich nicht beträchtlich differieren.

Die Ergebnisse der Tierversuche und die Eigenschaften des gereinigten Tetrodotoxins werden im nächsten Abschnitt Erwähnung finden.

Zur Reinigung des Tetrodotoxins läßt sich das Sublimat ebenso gut wie das Goldchlorid anwenden, da es aus der wässerigen Lösung des Tetrodotoxins die verunreinigende Base ausfällt, beim nachfolgenden Alkohol-Ätherzusatz dagegen vollständig in Lösung bleibt.

Die Eigenschaften des gereinigten Tetrodotoxins.

Das gereinigte Tetrodotoxin ist ein weißes, amorphes Pulver ohne Geruch und Geschmack, das in Wasser äußerst leicht, in Alkohol schwer und in den üblichen organischen Lösungsmitteln kaum löslich ist.

Beim Erhitzen bläht sich die Substanz unter Bräunung stark auf und läßt reichlich Kohle, die schwer verbrennbar ist, aber keine Asche zurück. Das Tetrodotoxin ist hygroskopisch.

Die wässerige Lösung dieser Subsanz wird durch Bleizuckerlösung nicht gefällt, wohl aber wird das Tetrodotoxin durch Bleiacetat nach weiterem Zusatz von Ammoniak mit Bleihydroxyd gemengt fast vollständig ausgeschieden. Durch wiederholtes Auswaschen dieses Niederschlages mit verdünntem Ammoniak geht fast gar keine Spur von Tetrodotoxin in Wasser über. Das Tetrodotoxin reduziert sowohl Fehlingsche Lösung als auch alkalische Silberlösung in auffallender Weise, nicht aber Ferricyankalium.

Die Giftigkeit des Tetrodotoxins wird durch Mineralsäuren, Ätzalkalien sowie durch starkes Ammoniak leicht zerstört. Die Substanz löst sich in konzentrierter Schwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure ohne Färbung auf. Die wässerige Lösung des Tetrodotoxins wird weder durch allgemeine Alkaloidreagenzien noch durch Eiweißfällungsmittel gefällt. Dieselbe ruft auch die Biuretreaktion nicht hervor. Durch kurzdauerndes Kochen der wässerigen Lösung verliert das Tetrodotoxin nicht seine Giftigkeit.

Durch subcutane Injektion wurde die minimale letale Dosis des gereinigten Tetrodotoxins bestimmt; sie ergab sich zu 0,0041 mg pro 1 g Körpergewicht für die Maus und zu 2,5 bis 4 mg pro 1 kg beim Kaninchen.

Um über die chemische Natur des Tetrodotoxins einen Anhalt zu gewinnen, habe ich, wie die nachstehenden Versuche zeigen, die Einwirkungen einiger Reagenzien auf das Tetrodotoxin studiert. Wegen Mangel an Material gelang es mir leider nicht, meine Untersuchungen zum definitiven Schluß zu bringen.

Einwirkung des Eisessigs auf das Tetrodotoxin.

Die bisherige Erfahrung lehrt, daß verdünnte Essigsäure selbst in der Kochhitze nicht erheblich auf das Tetrodotoxin

zersetzend wirkt. Es fragt sich aber, ob und wie es sich bei Eisessig verhält. Zur Feststellung dieser Frage wurden ca. 15 g rohes Tetrodotoxin (1 mg davon tötet eine 10 g schwere Maus bei subcutaner Injektion in etwa 10 Minuten) mit wenig Eisessig auf dem Wasserbade erhitzt, die Lösung von dem ungelöst gebliebenen Teil abfiltriert, und der letztere wiederholt mit Eisessig in derselben Weise wie vorher behandelt. Der zuletzt gebliebene Rückstand (10,3 g) wurde zuerst mit Alkohol, dann mit Äther gut gewaschen und im Exsiccator bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet (Gift A). Die essigsauren Auszüge gaben nach dem Erkalten in nicht unbedeutender Menge eine Ausscheidung, die mit Alkohol und Äther gewaschen und dann getrocknet wurde (Gift B).

Das von Gift B abgetrennte essigsaure Filtrat gab durch Zusatz von Äther ebenfalls eine ziemlich große Menge von Niederschlag (Gift C), der gleich den vorigen Niederschlägen behandelt wurde. Mit diesen drei Präparaten wurden Tierversuche an Mäusen angestellt.

Giftpräparat	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tode Min.
Gift A . . .	—	1	10
„ „ . . .	—	1	14
Gift B . . .	11,7	1	7
„ „ . . .	10,1	1	7,5
Gift C . . .	16,9	1	12

Es geht aus den Versuchen hervor, daß jede Fraktion noch ihre Giftigkeit behalten hat.

Behandelt man das Gift A noch weiter 5 mal mit Eisessig, so geht die Giftigkeit fast vollständig verloren. Der Niederschlag, der von den essigsauren Auszügen durch Zusatz von Äther gewonnen wurde, ist noch imstande, eine Maus zu töten, wie folgende Versuche zeigen:

Versuchstier	Körpergewicht g	Giftmenge mg	Zeit von der Injektion bis zum Tode
Maus	—	1	Besserung
„	13,6	2	16 Min.

Durch langdauerndes Kochen mit Eisessig wird die Giftigkeit des Tetrodotoxins teilweise zerstört, während ein Teil der Substanz unverändert wirksam bleibt.

Das Gift A wurde mit Eisessig gekocht, aus den so erhaltenen Auszügen durch Atherzusatz eine Ausfällung gewonnen, und mit der letzteren eine Analyse vorgenommen, die das folgende Resultat ergab:

1. 0,2046 g Substanz gaben 0,3004 g CO_2 und 0,1184 g H_2O.

C 44,04 %, H 6,49 %.

2. 0,1934 g Substanz gaben bei 7,8° und unter 750,7 mm Druck 4,8 ccm Stickstoff.

N 2,96 %.

Gefunden: C 40,04, H 6,49, N 2,96.

Vergleicht man die Analysenresultate mit denen des gereinigten Tetrodotoxins, so sieht man, daß der Unterschied nicht bedeutend ist. Demnach hatte scheinbar der Eisessig auf das Tetrodotoxin keinen stark zersetzenden Einfluß ausgeübt.

Einwirkung verdünnter Salzsäure auf das Tetrodotoxin.

1 Teil Tetrodotoxin wurde mit ca. 20 Teilen verdünnter Salzsäure (10 %) 3 Stunden auf dem Wasserbade unter Vermeidung des Verdampfens von Wasser erwärmt, wobei die allmählich braun werdende Lösung wenig Kohlenteilchen ausschied. Die von diesen Kohlenteilchen abfiltrierte Lösung wurde in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade verdampft, um den Überschuß von Salzsäure möglichst vollständig zu verjagen, sodann der dabei erhaltene schwarze Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle behandelt und das abfiltrierte Filtrat mit Goldchloridlösung versetzt. Das vom Niederschlag (A) abgetrennte Filtrat gab beim Stehen über Nacht ebenfalls in reichlicher Menge eine Ausscheidung (B).

(A) ist ein ziegelrotes, amorphes Pulver, während (B) ein gelbes Pulver darstellt. Im Capillarrohr erhitzt, zersetzt sich (A) gegen 181°, (B) gegen 181°, ohne einen bestimmten Schmelzpunkt zu zeigen. 0,0822 g des bei 100° getrockneten Niederschlages (B) gaben beim Glühen 0,0366 g Gold = 44,65 %.

Zersetzt man das Golddoppelsalz durch Schwefelwasserstoff, so erhält man eine farblose, krystallinische Substanz, die in Wasser leicht, schwer in Alkohol löslich ist. Beim Erhitzen mit Kalilauge zersetzt sich die Substanz unter Entwicklung schwach alkalisch reagierender Dämpfe.

Das Hydrochlorid der Base schmilzt bei 200° noch nicht. Die wässerige Lösung der Substanz wird durch Pikrinsäure sofort in schön gelb gefärbten Krystallen gefällt, die in kochendem Wasser leicht, dagegen in kaltem schwer löslich sind und daher aus kochendem Wasser leicht umkrystallisiert werden können.

0,0608 g des gereinigten Pikrats der Base gaben 0,0428 g Pikrinsäure = 70,40%.

Das Pikrat hat keinen Schmelzpunkt.

Die durch Zersetzen des Golddoppelsalzes gewonnene Base gibt dasselbe Pikrat wie die durch Kochen mit verdünnter Salzsäure entstandene Lösung.

Diese Versuche haben somit ergeben, daß eine basische Substanz bei der Einwirkung verdünnter Salzsäure auf das Tetrodotoxin entstanden ist. Die vom Golddoppelsalz abfiltrierte Lösung wurde durch Schwefelwasserstoff vom Gold befreit, auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit Alkohol versetzt, wobei eine weiße, pulverige Ausscheidung entstand. Nach Auswaschen mit Alkohol und Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur stellt die Substanz ein weißes, amorphes, sehr hygroskopisches Pulver dar.

Die wässerige Lösung wird durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Bleizucker usw. gefällt, nicht aber durch Mayers Reagens.

Man löst diese Substanz in Wasser, fällt mit Bleizucker, wäscht den weißen Niederschlag mit Wasser, zerlegt dann diesen durch Schwefelwasserstoff und filtriert das Schwefelblei ab. Die so gewonnene Lösung ist imstande, unter Kohlensäureentwicklung kohlensaures Barium zu zerlegen; die vom überschüssigen kohlensauren Barium abfiltrierte Lösung läßt beim Verdampfen eine geringe Menge von weißer Substanz zurück. Die wässerige Lösung dieser weißen Substanz gibt durch Silbernitrat eine weißliche Fällung, die sich durch Licht sowie durch Wärme bald zersetzt; dagegen wird die Lösung durch Sublimat nicht verändert. Die Lösung scheidet beim Versetzen mit Kupferacetatlösung einen bläulich gefärbten, gallertartigen Niederschlag aus, der beim Erwärmen etwas körnig wird, in Wasser selbst in der Wärme schwer, aber leicht in Essigsäure löslich ist.

Der durch Kupferacetat erzeugte, gut ausgewaschene Niederschlag ergab folgende Analyseresultate:

1. 0,1904 g Substanz gaben 0,1386 g CO_2 und 0,0473 g H_2O.
   C 19,85%, H 2,78%.
2. 0,0924 g Substanz gaben 0,0442 g CuO. Cu 38,22%.

Die weiße, amorphe Substanz scheint eine Säure zu sein, weil sie Carbonate zersetzt und durch Metallsalze gefällt wird. Was die chemischen Eigenschaften dieser Substanz betrifft, so soll ein weiteres Studium sie klarzulegen suchen.

Die Versuche, durch Zersetzung des Tetrodotoxins mit Alkalien, insbesondere mit Ätzbaryt, zu irgendeinem faßbaren Körper zu gelangen, haben bisher zu einem negativem Resultat geführt.

Schluß.

Vergleicht man das neue Verfahren der Darstellung des Tetrodotoxins mit dem alten Verfahren, das ich im Jahre 1894 in meiner ersten Mitteilung über die giftigen Bestandteile des Tetrodons veröffentlicht habe, so ist der Fortschritt ein ziemlich bedeutender, indem außer der Erzielung eines weit reineren Produktes erstens die umständliche und zeitraubende Arbeit der Dialyse und zweitens der Verbrauch einer größeren Menge von dem kostspieligen Silberoxyd vermieden werden.

Das neue Verfahren eignet sich außerdem zur Darstellung des Tetrodotoxins im großen besonders gut.

Durch diese Arbeit wurde ferner konstatiert, daß die Existenz eines zweiten krystallinischen Giftstoffes „Tetrodonin" zweifelhaft ist, der damals aus dem Filtrat vom tetrodonsauren Silber nach Entfernung des Silbers durch Fällung mittels absoluten Alkohols gewonnen wurde. Wahrscheinlich ist dieses nichts anderes gewesen, als eine krystallinische ungiftige Substanz, die mehr oder weniger mit Tetrodotoxin vermischt war. Im Tetrodon scheint bis jetzt nur ein einziger Giftstoff vorhanden zu sein, während das Tetrodotoxin identisch ist mit der früheren „Tetrodonsäure". Bei den Tierversuchen mit Kaninchen wurde die letale Dosis der früher gewonnenen Tetrodonsäure durch subcutane Injektion zu ca. 7 mg pro 1 kg Körpergewicht angegeben. Diejenige des nach dem neuen Verfahren gewonnenen Tetrodotoxins beträgt 4 mg pro 1 kg Körpergewicht.

Das Tetrodotoxin stellt ein weißes, sehr hygroskopisches Pulver vor, äußerst leicht löslich in Wasser und unlöslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln. Es besteht aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff, wovon der Stickstoffgehalt kaum 3% übersteigt. Als chemische Formel wird vorläufig $C_{16}H_{31}NO_{16}$ angenommen. Das Tetrodotoxin stellt eine chemisch neutrale Subsanz dar, aber es wird aus wässeriger Lösung durch Metallhydroxyd mitgefällt. Die Substanz ist weder Alkaloid noch Eiweißstoff. Das gereinigte Präparat enthält keine Spur von den beiden Verbindungen mehr.

Bei der Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf das Tetrodotoxin wird es in eine neue Base und eine stickstofffreie, krystallinische Substanz verwandelt. Verarbeitet man die Tetrodonrogen nach dem neuen Verfahren, so erhält man außer Tetrodotoxin stets eine krystallinische Base „Tetronin" und einen stickstofffreien krystallinischen Körper „Tetrodopentose" in geringer Ausbeute.

Möglicherweise sind die eben genannten Substanzen im Organismus nicht vorgebildet vorhanden, sondern durch Zersetzung der anderen Produkte neu entstanden.

In den männlichen Geschlechtsorganen mancher Fische befinden sich, wie bekannt, eine Anzahl Stoffe von stark basischem Charakter, die unter dem gemeinsamen Namen „Protamine" eine besondere Gruppe der Eiweißstoffe bilden. Von diesen sind Clupein, Scombrin, Sturin, Cyclopterin, Cyprinin usw. chemisch genauer untersucht. Die eben geschilderten Protamine wirken auf das Zentralnervensystem.

Faust spricht in seinem Werke „Die tierischen Gifte" seine Ansicht über das Tetrodongift folgendermaßen aus:

„Vergleicht man die von Takahashi und Inoko beschriebenen Wirkungen des Fugugiftes mit denjenigen der genannten Protamine, so bietet sich in deren Wirkung auf den Blutdruck und besonders in dem Einfluß dieser Stoffe auf die Respiration eine auffallende Ähnlichkeit, und es entsteht die Frage, ob nicht vielleicht die in Ovarien und Hoden von Tetrodonarten enthaltenen Protaminverbindungen die giftigen Eigenschaften derselben bedingen. Es könnte sich beim Fugugift um ein (nach den vorliegenden Daten etwa 3mal) giftigeres Protaminderivat handeln als das in Thompsons Versuchen geprüfte Clupein und Sturin.

Die Angabe der japanischen Forscher, daß der wirksame Körper des Fugugiftes, Taharas Tetrodonin, neutral reagiert, ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß in diesem und möglicherweise auch in der

Tetrodonsäure Verbindungen eines Protamins oder Protaminderivates mit anderen Stoffen vorliegen."

Was die chemische Natur des Giftstoffes anbelangt, so haben einzelne Forscher geteilte Meinungen. Der eine Forscher nimmt im Tetrodongift ein Protaminderivat an, während der andere es als cholinähnliche Substanz betrachtet. Diese beiden Ansichten sind aber nicht richtig, weil das Tetrodotoxin nur wenig Stickstoff, nämlich weniger als 2,8% enthält, während bei den Protaminen der Gehalt an Stickstoff etwa 16% beträgt.

Nimmt man also das Tetrodongift als ein Protaminderivat an, so müßte das Protamin offenbar mit einem hochmolekularen, stickstofffreien Körper verbunden sein. Wenn diese Annahme richtig wäre, so würde man bei der Hydrolyse des Tetrodotoxins als Spaltungsprodukte bekanntlich Hexonbasen bekommen, was jedoch in der Tat nicht der Fall ist. Die Möglichkeit, daß das Fugugift ein Protaminderivat sei, ist daher völlig ausgeschlossen.

Über die chemische Charakterisierung des Tetrodotoxins sowie der ungiftigen Stoffwechselprodukte der Eierstöcke sollen weitere Untersuchungen Aufschluß geben.

Indem ich die vorliegenden Resultate meiner Arbeit veröffentliche, behalte ich mir das Recht vor, auf diesem Gebiete meine Untersuchungen weiter zu verfolgen.

Zum Schluß spreche ich auch an dieser Stelle Herren M. Yamamoto, S. Ishikawa, G. Shirabe und J. Kanamori für ihre eifrige Unterstützung meinen besten Dank aus.

Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins.

Von

Walther Hausmann.

(Aus dem physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

[Ausgeführt mit Unterstützung der Kais. Akademie der Wissenschaften in Wien aus dem Legate Wedl.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

Vor längerer Zeit wurde mitgeteilt, daß Hämatoporphyrin einen stark wirksamen photobiologischen Sensibilisator für Paramaecien und Erythrocyten darstellt,[1]) ebenso wurde darüber berichtet, daß man auch Warmblütler (weiße Mäuse) durch diesen Farbstoff lichtempfindlich machen kann.[2]) Es war dies der erste Nachweis eines dem Tierkörper entstammenden, chemisch genau definierten Sensibilisators. Da nun dies Derivat des Blutfarbstoffes sich im normalen Harne des Menschen und des Kaninchens fast konstant findet [Garrod[3]), Stockvis[4])], da weiter sein Vorkommen in den Integumenten niederer Tiere nachgewiesen ist [Mac Munn[5])], so schien es mir von physiologischem Interesse, die photodynamische Wirkung dieses Körpers näher zu untersuchen. Zudem ließ auch das Auftreten des Farbstoffes im Harne bei einer Reihe von pathologischen Prozessen das Studium des Körpers in dieser Richtung erwünscht erscheinen.

---

[1]) W. Hausmann, diese Zeitschr. **14**, 275, 1908; **15**, 12, 1908; Wiener klin. Wochenschr. 21, Nr. 44, 1908.

[2]) W. Hausmann, Wiener klin. Wochenschr. 22, Nr. 52, 1909.

[3]) Journ. of Physiol. 17, 349 bis 352.

[4]) Centralbl. f. med. Wiss. 34, 177.

[5]) Zit. nach Malys Jahresber. 15, 325; 16, 348; 18, 240.

Hämatoporphyrin wurde zuerst von Mulder und van Goudouver[1]) durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf Hämatin erhalten.

Weitere Untersuchungen unternahm vor allem Hoppe-Seyler, von dem der Farbstoff seinen Namen erhielt.[2])

Nencki und Zaleski stellten Hämatoporphyrin durch Einwirkung von mit Bromwasserstoff gesättigten Eisessigs auf Hämatin dar.[3]) Die Analyse des Hämatoporphyrinchlorhydrates und des freien Hämatoporphyrins führten zur Aufstellung der Formeln $C_{16}H_{18}N_2O_3 . HCl$ bzw. $C_{16}H_{18}N_2O_3$. Zaleski[4]) nimmt neuerdings $C_{34}H_{38}N_4O_6$ als richtige Formel an.

Von den Eigenschaften des Hämatoporphyrins ist nun besonders eine optische, die Fluorescenz, von Bedeutung für die hier zu erörternde Frage der photobiologischen Sensibilisation, da aus den Untersuchungen v. Tappeiners und seiner Schule hervorgeht, daß nur fluorescierende Körper imstande sind, photodynamisch zu wirken.

Die Fluorescenz dieses Körpers wurde zuerst von Hoppe-Seyler gelegentlich seiner Untersuchungen über das Phylloporphyrin erwähnt. Bei Vergleich beider Substanzen bemerkt Hoppe-Seyler[5]) u. a.: „Auch in ihrem fluorescierenden Lichte, das ich früher beim Hämatoporphyrin außer acht gelassen, zeigt sich große Ähnlichkeit." Das Spektrum des Fluorescenzlichtes besteht aus einem Lichtband zwischen C. u. D.

Ebenso schreibt L. Marchlewski[6]): „Der Vergleich des Hämatoporphyrins mit dem Phylloporphyrin ergab, daß die Lösungen des Hämatoporphyrins in neutralen Lösungsmitteln, wie Alkohol und Äther, genau dieselbe Farbe und Fluorescenz besitzen wie die des Phylloporphyrins."

Merkwürdigerweise wird diese Eigenschaft des Hämatoporphyrins in den gebräuchlichen Lehrbüchern der physiologischen Chemie nicht erwähnt, obwohl sie zu den hervorstechendsten Merkmalen dieses Körpers gehört.

Die Fluorescenz wässeriger Lösungen des salzsauren Hämatoporphyrins ist sowohl bei saurer wie alkalischer Reaktion mittels einer Konvexlinie im Sonnenlicht leicht zu konstatieren.

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 32, 186.

[2]) Med.-chem. Unters., Berlin 1871 bis 1876.

[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. 30, 387.

[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. 43, 11.

[5]) Zeitschr. f. phys. Chem. 4, 193.

[6]) Chem. d. Chlorophylle, Braunschweig 1909, S. 163.

In alkalischen Lösungen ist der Kontrast zwischen der braunen Farbe bei durchfallendem Lichte und dem roten Strahl des Fluorescenzlichtes besonders charakteristisch. Auch in sehr verdünnten, kaum mehr gefärbten Lösungen hebt sich das rote Licht des einfallenden Lichtkegels deutlich von der fast farblosen Flüssigkeit ab.

Die Voraussetzung zum Zustandekommen photodynamischer Wirkung war demnach gegeben, und es konnte in der Tat die Sensibilisation von Paramaecien, Blutkörperchen und auch von Warmblütlern durch dies Derivat des Blutfarbstoffes nachgewiesen werden.

Daß man durch das dem untersuchten Farbstoffe so nahe verwandte Phylloporphyrin ebenfalls Blutkörperchen sensibilisieren kann, wurde schon früher gezeigt und hierdurch auf eine weitere Übereinstimmung zwischen den Derivaten des Hämoglobins und des Chlorophylls aufmerksam gemacht.[1])

Der Farbstoff, der in den hier mitgeteilten Versuchen verwendet wurde, wurde nach Nencki und Zaleski[2]) dargestellt. Das Hämin, aus dem Hämatoporphyrin erhalten wurde, war nach den Angaben von K. H. Mörner[3]) gewonnen worden.

Als Ausgangsmaterial wurden in allen Versuchen rote Blutkörperchen vom Pferde verwendet. Da, wie schon bemerkt, auch Warmblütler mit diesem Hämatophorphyrin lichtempfindlich gemacht wurden, so möchte ich ganz kurz hervorheben, daß die Verwendung eines „artfremden" Blutfarbstoffes in diesen Versuchen gleichgültig ist, da derart spezifische Eigenschaften an die Eiweißkomponente gebunden sind. Diese fehlt aber schon dem Hämine, dem Ausgangsprodukte für die Darstellung des Hämatoporphyrins.

Wenn im nachfolgenden von „Hämatoporphyrin" die Rede ist, so ist in den eigenen Versuchen immer krystallisiertes, exsiccatortrockenes Hämatoporphyrinchlorhydrat gemeint.

I. Sensibilisierung von Paramaecien.

Die wässerigen Lösungen des Farbstoffes sind im Dunkeln vollkommen unschädlich für Paramaecien. Wenn darauf ge-

[1]) W. Hausmann, diese Zeitschr. 17, 295.

[2]) l. c.

[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. 29, 187.

achtet wird, daß die Reaktion nur schwach alkalisch ist, so bleiben die Tiere auch in starken Konzentrationen des Hämatoporphyrins ganz ungeschädigt. Selbstverständlich ist saure Reaktion, bei der bekannten Empfindlichkeit dieser Infusorien gegen freie Mineralsäuren, zu vermeiden. Setzt man jedoch diese Lösungen einer nur ganz geringfügigen Belichtung aus, so gehen die darin enthaltenen Paramaecien rasch ein.

Am intensivsten wirkt Sonnenlicht, weniger stark das Licht einer Kohlenbogenlampe von 35 bis 40 Amp. Doch selbst das diffuse Licht trüber Wintertage wirkt abtötend auch noch bei sehr stark verdünnten Lösungen.

Die zum Versuche verwendeten Paramaecien wurden aus Heuinfus gezüchtet, durch Aufsteigenlassen in langen Röhren gereinigt. Die Belichtungsversuche wurden ausschließlich in Reagensgläsern ausgeführt. Die Infusorien wurden vor der Feststellung, ob lebendig oder tot, stets aufgeschüttelt und mit einer Lupe betrachtet, da es oft vorkommt, daß sich die Paramaecien auf dem Grund des Reagensglases ansammeln und sich nicht bewegen. Nach dem Aufschütteln schießen die lebenden Tiere lebhaft durcheinander, während die verendeten gleich wieder zu Boden sinken.

In allen Versuchen, die in der Sonne oder im Bogenlichte angestellt waren, wurden Wärmestrahlenfilter verwendet (Wasser oder saure 7%ige Eisensulfatlösung). In der überwiegenden Mehrzahl der Versuche jedoch wurde eine Belichtung gewählt, die an sich völlig indifferent für Paramaecien ist, d. i. das diffuse

Nr.	Menge der 0,2%igen Hämatoporphyrinlösung ccm	Menge der Paramaecienaufschwemmung vor der Teilung	Bemerkung	
			Im Lichte	Im Dunkeln
1	0,5	Überall je 5 ccm	verendet n. 17 Min.	Am nächsten Morgen alle am Leben
2	0,1		„ „ 25 „	
3	0,05		„ „ 30 „	
4	0,03		„ „ 40 „	
5	0,001[1])		Nach 7 Stunden tot aufgefunden	
6	0,0005			
7	0,0003			
8	0,0001		am Leben	

[1]) 0,1 ccm der ursprünglichen Lösung wurde bei Nr. 5 bis 8 auf 100 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung dann je 1, 0,5, 0,3, 0,1 ccm entsprechend 0,001, 0,0005, 0,0003, 0,0001 der Ausgangslösung zugesetzt.

Tageslicht, in dem die Paramaecienkultur überhaupt sich befand (vgl. Versuch).

0,2%ige Lösung von Hämatoporphyrin in phys. Kochsalzlösung. Nach Zusatz des Farbstoffes in der Paramaecinaufschwemmung werden die Proben geteilt, die eine Hälfte belichtet, die andere im Dunkeln belassen. Die Belichtung erfolgt zwischen Doppelfenstern nach Süden auf weißer Grundlage. Trüber Tag. Versuch vom 7. II. 1910.

Die Dunkelkontrollen waren nach 24 Stunden vollkommen ungeschädigt. Nach dieser Zeit wurden auch sie ins diffuse Tageslicht gebracht. Die Belichtung erfolgte wie oben angegeben. Trüber Tag. Die Paramaecien der Proben Nr. 1 bis 7 verendeten ebenso wie die in den entsprechenden Proben des Vortages. In diesem Versuche ist demnach die Wirkung des Hämatoporphyrins im Lichte eines trüben Wintertages noch bei einer Verdünnung von 1 : 80000 zu konstatieren gewesen.

Ähnliche Versuche wurden im Sonnenlichte und im Kohlenbogenlichte unternommen. Bei dieser Art der Belichtung verenden die Paramaecien in den etwas konzentrierten Lösungen des Farbstoffes in wenigen Minuten, die Dunkelkontrollen bleiben auch in diesen Versuchen tagelang am Leben.

Die Versuche im Bogenlichte eignen sich sehr gut zur Demonstration in der Vorlesung mit dem Projektionsapparate. Man gibt hierbei die Paramaecien in kleine Fläschchen mit planparallelen Wänden, wie sie zu spektroskopischen Zwecken verwendet werden, hierbei muß für ausgiebige Kühlung am besten in einer mit Wasser gefüllten großen Glaswanne mit planparallelen Wänden Sorge getragen werden, denn sonst gehen auch normale Paramaecien bald zugrunde. Bei richtiger Ausführung des Versuches sieht man die Tiere auf dem Projektionsschirme lebhaft durcheinander schießen. Tauscht man nun dies Fläschchen mit den normalen Tieren gegen ein solches um, in dem im Dunkeln völlig ungeschädigte Paramaecien sich in einer Hämatoporphyrinlösung befinden, so werden die anfänglich lebhaften Tiere durch das Licht der Projektionslampe rasch geschädigt. Sie beginnen korkzieherartige Bewegungen zu machen, werden unbeweglich, und nun sieht man die abgetöteten Tiere langsam zu Boden fallen. Man verwendet am zweckmäßigsten 5 ccm Paramaecienaufschwemmung mit Zusatz von 0,1 ccm einer 0,2%igen Hämatoporphyrinlösung.

II. Sensibilisierung von roten Blutkörperchen.

Der Nachweis photodynamischer Eigenschaften, der in erster Linie mittels der relativ schwer zu beschaffenden Paramaecien geführt wurde, ist sehr rasch ausführbar geworden, seitdem die Untersuchungen von Hans Sachs-Sacharoff[1]) und von Hermann Pfeiffer[2]) gezeigt haben, daß man auch rote Blutkörperchen zu diesen Versuchen verwenden kann. Bei Anwendung eines Lichtes von geeigneter Qualität und Quantität kann man rote Blutkörperchen unter Kühlung ohne weitere Schädigung belichten. Nur besonders intensive Belichtung ist imstande, rote Blutkörperchen auch ohne Sensibilisation — d. h. auch ohne besonders beigefügte Sensibilisatoren — zu zerstören. Werden jedoch gewisse fluorescierende Substanzen zugesetzt, so tritt auch bei an sich unwirksamer Bestrahlung Hämolyse ein.

Auf diese Weise ist die photodynamische Wirkung des Hämatoporphyrins ohne weiteres an Erythrocyten nachzuweisen. Im Dunkeln ist eine entsprechend hergestellte Lösung stundenlang ohne Wirkung, im Lichte jedoch wirkt sie rasch und intensiv hämolysierend.

Versuch.

0,01 g Hämatoporphyrin wird in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst, die saure Lösung mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Als Blutkörperchenaufschwemmung wurde eine 0,2%ige Suspension 4mal gewaschener Erythrocyten vom Kaninchen verwendet. Die Proben wurden nach Zusatz der Farbstofflösung geteilt, eine Hälfte belichtet, die andere im Dunkeln gehalten. Die Belichtung erfolgte im Bogenlichte unter Wasserkühlung.

Menge der zugesetzten Hämatoporphyrinlösung ccm	Menge der Blutkörperchenaufschwemmung vor der Teilung	Bemerkung	
		Im Lichte	Im Dunkeln
1,0	Überall je 10 ccm	komplett nach 13 Min.	Nach 2 Stunden negativ
0,5		Hämolyse „ 14 „	
0,3		nach 16 Min.	

Der sensibilisierenden Wirkung des Farbstoffes auf rote Blutkörperchen scheint eine Bindung an dieselben vorherzugehen,

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 7.

[2]) Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9.

wie sie von Harzbecker und Jodlbauer für einige Sensibilisatoren beschrieben wurde.[1])

Versuch.

Zu 20 ccm gewaschener Erythrocytenaufschwemmung 0,1% wird 1 ccm einer Lösung von 0,02 g Hämatoporphyrin in 10 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung zugesetzt (Probe I). Als Kontrolle wird zu 20 ccm derselben Aufschwemmung 1 ccm physiol. NaCl-Lösung zugesetzt. Die Proben werden um $^1/_2$1 Uhr angesetzt und bis $^1/_2$3 Uhr dort belassen: keine Hämolyse. Sodann werden beide Proben mit NaCl-Lösung auf 50 ccm aufgefüllt und in derselben Zentrifuge 6mal mit frisch aufgegossener Kochsalzlösung zentrifugiert. Hierauf wird das letzte Waschwasser von Probe I mit den Erythrocyten von Probe II vereinigt und umgekehrt das letzte Waschwasser von Probe II mit den Erythrocyten von Probe I. Die Proben werden aufgeschüttelt und entsprechend in der Sonne belichtet. Probe I ist nach 10 Min. komplett hämolytisch, Probe II nach 30 Minuten negativ. Probe II kommt nun ins Bogenlicht, nach 1 Stunde negativ, nach 1$^1/_2$ Stunden beginnende Hämolyse, die bald komplett wird.

Vorbelichtungsversuche.

Beim Nachweis photobiologischer Sensibilisationen muß immer an die Möglichkeit gedacht werden, daß durch das Licht aus dem zu prüfenden Farbstoffe giftige Substanzen abgespalten werden, die dann eine Sensibilisation vortäuschen würden. Solche Einwände wurden schon H. v. Tappeiner mit Unrecht gemacht. Es erscheint jedoch in jedem einzelnen Falle nötig zu untersuchen, ob vorbelichtete Lösungen giftig sind, da sich die verschiedenen Farbstoffe dem Lichte gegenüber ganz verschieden verhalten können. Bei dem hier in Frage stehenden Farbstoffe läßt es sich ohne weiteres ausschließen, daß ein durch Vorbelichtung entstehender Körper die Ursache der Giftwirkung im Lichte ist.

Es zeigt sich kein Unterschied in dem Verhalten einer Hämatoporphyrinlösung gegenüber Paramaecien, ob die Farbstofflösung vorher belichtet war oder nicht. Auch geht die sensibilisierende Wirkung durch Vorbelichtung nicht verloren. Hingegen ist durch intensive Belichtung eine Farbenänderung der Hämatoporphyrinlösung zu erzielen. Der mehr oder minder rötliche Farbenton der alkalischen Lösung macht einem tiefbraunen Platz. Nachstehend ist ein Vorbelichtungsversuch mit Paramaecien wiedergegeben.

[1]) Diese Zeitschr. 12, 306.

Versuch.

0,02 g Hämatoporphyrinlösung werden in 10 ccm Brunnenwasser gelöst, die Reaktion ist schwach alkalisch. Die Lösung wird geteilt, die eine Hälfte unter Wasserkühlung am 28. I. 1910 durch 2 Stunden in der Sonne belichtet, die andere ins Dunkle gestellt. Ebenso werden Paramaecien unter steter Wasserkühlung durch 2 Stunden in der Sonne belichtet. Von dieser vorbelichteten Farbstofflösung werden je 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 ccm zu je 2 ccm der vorbelichteten Paramaecien, ebenso die im Dunkeln gehaltene Lösung zu einer gewöhnlichen Aufschwemmung der Infusorien zugesetzt. Alle Proben werden sofort ins Dunkle gebracht. Nach 18 Stunden sind in allen Proben beider Versuchsreihen die Tiere am Leben. Sie werden nunmehr unter Kühlung in die Sonne gebracht, wo sie sämtlich in wenigen Minuten verenden.

In dem eben geschilderten, wie in zahlreichen anderen Versuchen waren auch die Paramaecien vorbelichtet worden. Es ist demnach auch völlig ausgeschlossen, daß die Wirkung des Hämatoporphyrins durch Schädigung der Versuchstiere durch das Licht zustande kam. Sehr häufig standen die zur Benützung gelangenden Lösungen des Farbstoffes im diffusen Lichte, in dem die Paramaecien konstant gehalten wurden. Ein großer Teil aller Versuche ist demnach mit vorbelichtetem Materiale zustande gekommen.

Genau dieselben Resultate ergaben Versuche mit intensiv vorbelichteten Hämatoporphyrin-Lösungen und ebensolchen Blutkörperchen. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins auf Erythrocyten ist demnach ebensowenig auf Entstehung giftiger Stoffe durch die Vorbelichtung zurückzuführen, wie die Giftwirkung im Lichte bei Paramaecien.

In welchen Strahlen wirkt Hämatoporphyrin sensibilisierend?

Durch Verwendung geeigneter Strahlenfilter wurde festgestellt, daß Hämatoporphyrin in den Strahlen um 500 $\mu\mu$ sensibilisierend wirkt. Die Wirkung aller optischen Sensibilisatoren ist auf gewisse Strahlenbezirke beschränkt, und zwar auf jene, die von ihnen absorbiert werden. Als Strahlenfilter diente eine 3 cm dicke Schicht von konzentriertem Kupfersulfat zur Absorption der langwelligen Strahlen bis etwa 550 $\mu\mu$, eine konzentrierte Lösung von Kaliumbichromat zur Absorption der kurzwelligen Strahlen bis etwa 548 $\mu\mu$, sowie eine konzentrierte Lösung von Pikrinsäure zur Absorption von Blau bis ins äußerste Ultraviolett. Zur Kontrolle diente eine 3 cm dicke

Wasserschicht. In 10 ccm der Paramaecienaufschwemmung wurden 0,1 cm einer 0,2%igen Lösung von Hämatoporphyrin zugesetzt. Die Belichtung erfolgte im diffusen Lichte eines trüben Novembertages.

Hinter der Wasserschicht wurden die Paramaecien nach 20 Minuten tot gefunden, hinter Kupfersulfat nach $^3/_4$ Stunden, hinter dem Pikrinsäureschirm nach 1 Stunde. Die Tiere, die durch Kaliumbichromat geschützt waren, lebten mehrere Tage im diffusen Tageslichte.

Ebenso kann man die Paramaecien durch Vorlage einer verdünnten Lösung des alkalischen Hämatoporphyrins vor den Wirkungen des Lichtes schützen.

Es sind demnach die von der alkalischen Hämatoporphyrinlösung zwischen E. und F. absorbierten Strahlen hauptsächlich wirksam gewesen.

Ob nicht auch die ultravioletten Strahlen bei der photodynamischen Wirkung des Farbstoffes mitwirken, ist in diesen Versuchen nicht zu entscheiden, da dieselben in allen Versuchen durch die Verwendung von Glasgefäßen ausgeschlossen waren.

III. Sensibilisierung von Warmblütlern.

Eine Sensibilisierung von Warmblütlern durch Farbstoffe ist nur dann möglich, wenn diese Körper nicht auch im Dunkeln giftig wirken. Es war an sich wahrscheinlich, daß Hämatoporphyrin, das ja unter pathologischen Prozessen sehr oft in größerer Menge im Harne sich findet, keine besonders giftigen Eigenschaften entfalten würde. Auch die bisher vorliegenden Erfahrungen über die Verabreichung des Farbstoffes an verschiedene Tiere ließen den Versuch einer subcutanen Sensibilisierung durchführbar erscheinen.

Die früheren Untersuchungen, in deren Verlauf Hämatoporphyrin verabreicht worden war, wurden zu dem Zwecke angestellt, um die Ausscheidungsverhältnisse des Farbstoffes und sein Verhalten im Tierkörper überhaupt zu studieren. Diese seien kurz wiedergegeben und auch mit einigen Worten der uns später interessierenden Ausscheidungsart gedacht.

Nencki und Sieber[1]) verabreichten einem Kaninchen 0,1 g des reinen Natronsalzes subcutan in wässeriger Lösung.

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 24, 430, 1888.

Der Harn, der 5 und 10 Stunden nach der Injektion sowie am folgenden Tage mit Katheter entnommen wurde, enthielt kein unverändertes Hämatoporphyrin. Nach 3 Wochen wurden demselben Tier 0,4 g an zwei Stellen subcutan injiziert. Der 5 Stunden später entnommene Harn enthielt geringe Mengen. Am Morgen des folgenden Tages wurden noch Spuren gefunden. 5 Stunden später war der Farbstoff nicht mehr nachweisbar. Das Tier blieb bis auf einen Absceß an einer der Injektionsstellen gesund.

Ein anderes Kaninchen, das 1,5 g subcutan erhalten hatte, ging nach 3 Tagen ein. Inwiefern hier eine etwaige Wirkung der Belichtung mitgespielt hat, ist aus den Protokollen nicht ersichtlich. Ein Hund von 13 kg erhielt ohne Schädigung 0,7 g Hämatoporphyrin per os. Im Kot war das Pigment in geringer Menge nachweisbar, im Harne nicht.

Neubauer[1]) injizierte einem Hunde von 5,34 kg 0,14 g subcutan. Das Tier, das nach 8 Stunden getötet wurde, zeigte keine abnormalen Erscheinungen. Der Harn enthielt nur geringe Spuren des Farbstoffes, hingegen wurde zum ersten Male gezeigt, daß der Körper durch die Galle ausgeschieden wird. Diesen Befund Neubauers konnte ich in einer großen Reihe von Versuchen an Mäusen durchaus bestätigen. Wenn Mäuse einige Stunden nach der Injektion größerer Mengen getötet werden, so sieht man die Gallenblase sowie das Duodenum schwappend gefüllt mit einer roten Flüssigkeit, die ungemein viel Hämatoporphyrin enthält.[2]) Die relative Ungiftigkeit des Farbstoffes ermöglichte es demnach, Sensibilisationen von Warmblütlern mittels Hämatoporphyrin auszuführen. Die Versuche wurden mit weißen, grauen und schwarzen Mäusen ausgeführt. Es seien zunächst die Befunde mit weißen Mäusen mitgeteilt und unter Hinweis auf die beigefügten Protokolle die verschiedenen Vergiftungsbilder besprochen.

Wie schon bemerkt, ist krystallisiertes, salzsaures Hämatoporphyrin im Dunkeln unschädlich. Weiße Mäuse von 10 bis 15 g vertragen ohne weiteres eine Injektion von 0,01 g des

[1]) Ebenda 43, 456, 1900.

[2]) Es hat überhaupt den Anschein, als würden fluorescierende Körper mit Vorliebe durch die Galle ausgeschieden, so zeigten auch Jodlbauer und Busck die Ausscheidung von Erythrosin durch die Galle.

Farbstoffes in ganz schwach alkalischer Lösung. Es ist natürlich notwendig, die Lösung nicht zu stark alkalisch zu machen, noch schädlicher ist die Verwendung saurer Flüssigkeit bei subcutaner Injektion. Wenn im nachfolgenden nur von Hämatoporphyrin die Rede ist, so ist, wie nochmals bemerkt sei, immer krystallisiertes salzsaures Hämatoporphyrin gemeint.[1])

Beläßt man die mit dem Farbstoffe injizierten weißen Mäuse im Dunkeln, so ist auch nach vielwöchentlicher Dauer keine Veränderung an den Tieren, die sich anscheinend gar nicht von normalen Mäusen unterscheiden, wahrzunehmen. Belichtet man jedoch die vorbehandelten Tiere, so zeigen sie eine Reihe ganz charakteristischer Erscheinungen, die zum Tode oder zu dauernden Veränderungen führen. Der Übersicht halber ist es zweckmäßig, die im Lichte erhaltenen Vergiftungsbilder in drei Kategorien zu teilen, und eine akute, eine subakute und eine chronische Form zu unterscheiden.

1. Akute Form.

In diesen Fällen erfolgt der Tod der Versuchstiere 1 bis 3 Stunden nach Beginn der Belichtung.

2. Subakute Form.

Die Tiere gehen in 1 bis 2 oder mehr Tagen nach Einsetzen der Belichtung zugrunde.

3. Chronische Form. Diese Krankheit kann sich über Wochen und Monate erstrecken.

Ob nun die eine oder die andere Form dieser Sensibilisationskrankheit bei den belichteten Tieren zustande kommt, hängt von mehreren Umständen ab. In allererster Linie ist die Art der Belichtung entscheidend, der die Tiere ausgesetzt werden. Je intensiver sie ist, um so stürmischer verlaufen die Erscheinungen bei den sensibilisierten Tieren. So gelingt es leicht, alle drei Krankheitsformen bei Mäusen zu erzielen, die zur selben Zeit mit derselben Hämatoporphyrinmenge injiziert wurden und auch in der gleichen Stunde dem Lichte ausgesetzt waren. Je nach der Art der Belichtung (Sonne, helles diffuses

[1]) In einigen Versuchen hatte ich ein nicht krystallisiertes Präparat, das noch durch Mutterlaugen verunreinigt war, verwendet. Dies war an sich giftig und tötete die Tiere auch im Dunkeln unter inkonstanten, mit der „Licht"wirkung des Hämatoporphyrins nicht zu verwechselnden Symptomen.

Tageslicht, mattes diffuses Tageslicht) stellte sich die akute, subakute oder chronische Form ein. (Vgl. Versuch 1, S. 296.) Daneben ist von Bedeutung, wie lange Zeit zwischen Verabreichung des Farbstoffes und der Belichtung verflossen ist. Je mehr Zeit zwischen Injektion und Bestrahlung verstreicht, um so schwächer werden die Symptome. Eine Maus, die 2 bis 3 Tage nach der Injektion von 0,002 g Hämatoporphyrin noch akut unter der Belichtung sterben würde, kann nach 3 bis 4 Wochen fast unbeschadet einer recht intensiven Lichtquelle ausgesetzt werden.

Die Menge des Farbstoffes ist, abgesehen von einer unteren Grenze, nicht so sehr bestimmend für den Ablauf der Sensibilisationskrankheit.

Werden die Tiere einer sehr schwachen Belichtung ausgesetzt, so können sie am Leben bleiben. Gewöhnlich entwickeln sich dann auch nur ganz geringfügige Symptome.

Bei allen nachstehend mitgeteilten Versuchen wurde immer zugleich mit der sensibilisierten Maus auch ein nicht vorbehandeltes Kontrolltier belichtet. In keinem einzigen Falle trat eine merkliche Schädigung bei diesen Tieren ein. Da die „Hämatoporphyrinmäuse" immer vor der Belichtung im Dunkeln gehalten wurden, so war mit den Kontrollen ebenso verfahren worden. Ebenso wurden sensibilisierte Tiere ohne Schädigung viele Stunden bei 30 bis 35° C im Brutschrank im Dunkeln gehalten, bei einer Temperatur, die bei den intensivsten Belichtungsversuchen auch nicht annähernd erreicht wurde. Es seien nun die einzelnen Vergiftungsformen mitgeteilt.

I. Akute Form.

Entnimmt man eine im Dunkeln befindliche Maus, die vor kurzem Hämatoporphyrin erhalten hat, dem Käfig, so ist im Halbdunkeln nichts Abnormes zu bemerken. Die Tiere sind munter und suchen zu entrinnen. Die Ohren sind blaß, Augen normal usw. Betreffs der Ohren muß darauf geachtet werden, daß ältere Tiere meist etwas injizierte Ohrmuscheln haben. Auch verhält sich die Füllung der Blutgefäße in den Ohrmuscheln bei den Tieren verschieden. Da nun die Beobachtung der Blutfülle der Ohren in diesen Versuchen sehr wichtig ist, so ist es zweckmäßig, Tiere mit ganz blassen Ohren zu verwenden.

Die mit Hämatoporphyrin sensibilisierten Tiere wurden nun starken Lichtquellen ausgesetzt. In einer Reihe von Versuchen wurden sie direkt der Sonne exponiert. Es geht natürlich nicht an, die Mäuse ohne jede Schutzvorrichtung auf diese Weise zu belichten, da man danach trachten muß, die Mäuse vor den Wärmestrahlen zu schützen. Die Sonnenbelichtung wurde deshalb — besonders in den Sommermonaten — folgendermaßen vorgenommen. Die injizierte Maus und das normale Kontrolltier befanden sich in einem Becherglase, das in einem größeren, mit Wasser gefüllten stand oder schwamm. Das Wasser in dem äußeren Glase wurde öfters gewechselt. Bei Befolgung dieser Vorschriften konnte man normale weiße Mäuse in Wien viele Stunden lang der Julisonne aussetzen, ohne daß die Tiere irgendwie geschädigt erschienen.

Sehr oft wurde als Lichtquelle das Licht einer Projektionsbogenlampe von ca. 35 Amp. benutzt, zwischen dem Gefäße, in dem die Mäuse exponiert wurden (einem Becherglase oder einer Glascuvette) befand sich eine 10 cm dicke Wasserschicht zwischen zwei Glasplatten. Die Mäuse waren gewöhnlich in einer Entfernung von 80 cm von der Lichtquelle aufgestellt. Auch diese Belichtungsart ist für weiße Mäuse völlig unschädlich. Die normalen Tiere sitzen vollkommen ruhig oder fressen usw. In einer Reihe von Versuchen wurde 8mal hintereinander dieselbe Kontrollmaus verwendet, sie war nach diesen vielen Bestrahlungen scheinbar normal. In der Regel jedoch wurde die Kontrollmaus immer nur für einen Versuch gebraucht. An sehr hellen Sommertagen genügt auch das helle diffuse Tageslicht, um akuten „Hämatoporphyrinismus" zu erzeugen.

Bei den mit Hämatoporphyrin entsprechend sensibilisierten Tieren entwickelt sich nun bei den eben besprochenen Belichtungsarten ausnahmslos folgendes Bild.

Schon wenige Minuten nach dem Beginne der Belichtung zeigen die Tiere intensivste Reizerscheinungen an der Körperoberfläche. Die Mäuse kratzen sich heftigst, wälzen sich am Boden des Gefäßes. Besonders charakteristisch ist es, wie die Tiere die Schnauze am Boden reiben. Sehr oft werden alle zugänglichen Körperteile mit großer Intensität benagt, und wenn die Injektionsstelle sich am Abdomen befindet, so kratzen und

nagen die Tiere dort ganz besonders wütend. In der Regel treten, wie schon bemerkt, diese Reizerscheinungen einige Minuten nach dem Einsetzen der Bestrahlung ein, doch konnte ich auch beobachten, daß in demselben Momente, in dem das Tier von den Strahlen getroffen wird, auch schon das Kratzen usw. beginnt. (Vgl. Vers. 5, S. 298.) Nach wenigen Minuten röten sich die Ohren der Tiere, die bei Beginn der Exposition gewöhnlich ganz blaß waren. Sie scheinen diffus gerötet, auch die Gefäße treten stärker injiziert hervor. Diese Rötung der Ohren, die auf Druck verschwindet, ist ganz ungemein charakteristisch.[1]) Nicht so stark wie die Rötung der Ohren ist die der unbehaarten Teile der Extremitäten und des Schwanzes. Sehr deutlich jedoch die oft tief dunkelrote Verfärbung der Schnauze.

Zugleich mit der Rötung der Ohren treten Schwellungen derselben auf, ebenso eine jedoch nicht sehr deutliche Stellungsveränderung, die besser bei der subakuten Form zu beobachten ist und auch mit dieser zusammen besprochen wird. Ebenso sind leichte Schwellungen der Körperhaut, die auf Ödemen beruhen, bei der akuten Form viel weniger häufig und intensiv als bei den weniger rasch verlaufenden Fällen.

Ziemlich gleichzeitig mit den Verfärbungen der Ohren zeigt sich eine ganz ausgesprochene Lichtscheu der sensibilisierten Mäuse. Während normale oder mit physiologischer Kochsalzlösung injizierte Tiere ohne weiteres in das Licht der Bogenlampe blicken, vermeidet die „Hämatoporphyrinmaus" dies vollkommen. Sie wendet sich vom Lichte ab, sitzt mit geschlossenen Augen da und versteckt sich — wohl auch aus allgemeinem Schattenbedürfnis — hinter das normale, in demselben Gefäße befindliche Kontrolltier. Sehr oft verkleben die Augenlider der Tiere, doch geht diese Erscheinung häufig sehr rasch zurück, so daß es den Anschein hat, als handle es sich um eine rasch auftretende und verschwindende Conjunctivitis. In einigen Fällen wurde reichliche Absonderung von Nasensekret beobachtet.

Zu all diesen Symptomen treten bald allgemeine Erscheinungen.

---

[1]) Sie ist im Bogenlichte schwer zu sehen, man muß deshalb die Tiere zur Beobachtung ins diffuse Tageslicht bringen.

Ziemlich oft ist gesteigerte Empfindlichkeit zu konstatieren. Die Tiere quietschen manchmal spontan, manchmal bei Berührung (vgl. Vers. 4 u. 5, S. 298), und speziell in diesen Fällen versuchten die Tiere ihrem Behälter zu entkommen. In einigen Fällen sprangen die Tiere krampfhaft mehrmals hintereinander in die Höhe und verblieben dann nach dem Niederfallen oft in ganz unnatürlichen Körperstellungen.

Nach 1stündiger Belichtung etwa zeigen die Tiere keine so ausgesprochenen Reizerscheinungen mehr. Das heftige Kratzen und Scheuern läßt nach, ebenso die oben beschriebenen Rötungen der Ohren usw. Auffällig ist in diesem Stadium eine jedoch nicht konstant auftretende Dyspnoe. Die Mäuse werden nun meist ruhig. Sie liegen matt da, legen sich endlich auf die Seite und verenden. Manchmal, jedoch nicht konstant, tritt agonal Tetanus auf.

Die Dauer dieser akuten Fälle schwankt zwischen 1 bis 3 Stunden.

Besonders auffallend ist, daß nach einer Belichtungsdauer von etwa $^3/_4$ Stunden im Bogenlichte bei den schon schwer krank erscheinenden Tieren alle Symptome wie mit einem Schlage verschwinden, wenn man sie aus dem Bereiche der Lichtstrahlen entfernt. Die Mäuse scheinen nun wieder völlig normal zu sein, und man hält es kaum für möglich, daß man dasselbe Tier vor sich hat, das man eben schwer affiziert im Lichte gesehen hatte. Selbstverständlich bewirkt in den letzten Stadien der akuten Form die Entfernung aus dem Licht nicht mehr ein Verschwinden der Krankheitssymptome.

Die Sektion der Tiere ergibt, wenn wie erwähnt die Injektion kurze Zeit vor der Belichtung erfolgt, als besonders charakteristischen Befund die pralle Füllung der Gallenblase, des Duodenums, sowie der Anfangsschlingen des Jejunums mit einer rötlichen Flüssigkeit, in der Hämatoporphyrin in großen Mengen nachweisbar ist. Wird jedoch die Belichtung einige Tage nach der Injektion vorgenommen, so findet man die Därme blaß und leer. Die Ausscheidung dieser roten Flüssigkeit ist demnach nicht in Zusammenhang zu bringen mit dem Tode der Tiere, sie zeigt uns nur sehr demonstrativ den von Neubauer beschriebenen Ausscheidungsmodus des subcutan beigebrachten Hämatoporphyrins. Die inneren Organe weisen

durchweg eine starke venöse Hyperämie ohne sonstige abnormale Erscheinungen auf. Die Milz ist manchmal vergrößert, der Befund ist kein konstanter.

Mikroskopischer Befund: Zwischen Cutis und Subcutis befindet sich ein leichtes Ödem mit ziemlich zahlreichen Leukocyten, die besonders gegen die Muskelschicht zunehmen. Die Ohren zeigen ebenfalls Ödem zwischen Cutis und Subcutis mit Leukocytenemigration. Es sei besonders hervorgehoben, daß die inneren Organe keine Ödeme aufweisen, und daß an den Nieren, abgesehen von starker Hyperämie, keine krankhaften Veränderungen konstatiert werden konnten.

Werden die Tiere durch Dekapitation getötet, wenn sie beginnen einen moribunden Eindruck zu machen, so fällt hier — mehr noch bei der subakuten Vergiftung — auf, eine wie geringe Blutmenge beim Ausblutenlassen zu erhalten ist.

II. Subakute Form.

Gestaltet man die Belichtung der weißen Mäuse, die Hämatoporphyrin erhalten hatten, minder intensiv, so treten, wie schon bemerkt, die Erscheinungen weniger heftig auf, es kommt zur Ausbildung eines ungemein charakteristischen Symptomenkomplexes. Die stürmischen Reizerscheinungen treten zurück vor den sich in erster Linie ausbildenden Veränderungen der Körperoberfläche.

Zur Erzielung dieser Form eignet sich u. a. sehr zweckmäßig eine mehrstündige Exposition in matter Wintersonne an nebligen Tagen. Ebenso führt im März und April ein Verbringen in das helle diffuse Tageslicht vor einem Fenster (ohne Sonne) zum Ziele. In den Sommermonaten jedoch ist diese zweite Art der Belichtung (von Sonnenbestrahlung ist natürlich keine Rede) eine zu intensive. In dieser Jahreszeit müssen die Mäuse möglichst in der Mitte eines hellen Zimmers, nicht allzu nahe vom Fenster gehalten werden.

Die ersten Symptome, die sich nach dem Beginn der Exposition einstellen, deuten ebenso wie bei der akuten Form auf starke Reizerscheinungen seitens der Haut. Es erfolgt Kratzen, Wälzen, wenn auch nicht so intensiv wie bei den stärker belichteten Tieren. Sehr auffällig ist die sehr bald deutlich hervortretende Rötung der Ohren, die hier eher noch

stärker ist als in den obigen Versuchen. Die intensiv roten Ohrmuscheln heben sich ganz scharf ab von dem weißen Kopfe.

Auch die unbehaarten Teile der Extremitäten und vor allem die Schnauze röten sich stark.

Zur Farbenveränderung der Ohren kommt eine sich ziemlich rasch ausbildende abnormale Ohrenstellung. Während die Ohrmuschel der normalen weißen Maus dem Kopfe mehr oder minder anliegt, beginnen die Ohren der sensibilisierten Tiere kurz nach dem Beginne der Belichtung sich aufzurichten. Die Öffnung ist nach einiger Zeit nach vorn gewendet, die Ohrmuschel liegt dem Kopfe nicht mehr an, sondern sie bildet einen nach vorn und seitlich offenen Trichter.

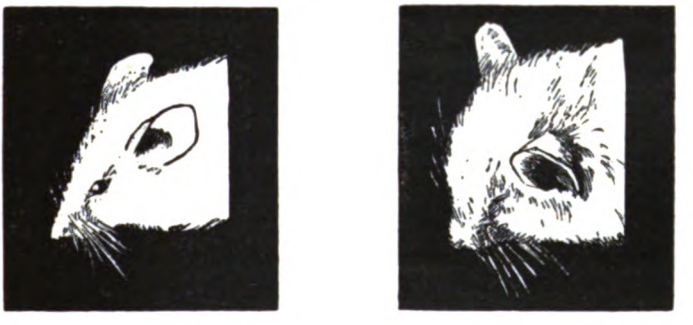
Das hervorstechendste Symptom der subakuten Form jedoch sind Hautödeme, die über den ganzen Körper der Tiere sich erstrecken und ihnen ein sehr charakteristisches und merkwürdiges Aussehen verleihen. Während die akuten Fälle das Hautödem gewöhnlich nur mikroskopisch erkennen lassen, dominiert es in diesen langsamer verlaufenden. Der Kopf erscheint mächtig gedunsen, der Nasenrücken ist stark vorgewölbt, die Augen liegen tief unter der Oberfläche. Hierzu kommt die schon erwähnte Stellung der Ohren, die ebenfalls geschwellt sind. Die abnorme Ohrenhaltung ist wohl auch auf das Ödem zu beziehen.

Brust, Rücken und Bauchhaut sind manchmal ganz ungemein stark ödematös. In einem Falle betrug der Querschnitt durch die Brusthaut etwa das 6fache des normalen.

Diese Hautödeme verändern das Aussehen der Tiere derartig, daß eine Maus, die sich vor der Belichtung in keiner Beziehung von einer normalen unterscheidet, nach einigen Stunden den Eindruck macht, als ob sie einer ganz anderen Spezies angehörte.

Ein subakuter, durchaus nicht extremer Fall ist in der nebenstehenden Fig. 1 wiedergegeben. Fig. *a* stellt den Kopf einer weißen Maus von 17 g 4 Stunden nach der Injektion von 2 mg Hämatoporphyrin dar; das Tier war am 14. Juni 1910 um 4 Uhr nachmittags injiziert worden, dann um 8 Uhr abends bei ganz schwachem Dämmerlicht gezeichnet, auch dieses Licht schien dem Tier schon einiges Unbehagen zu verursachen, und bei Beendigung der Zeichnung begann das Tier schon sehr un-

ruhig zu werden und sich heftig zu kratzen. Nun wurde das Tier bis zum 16. Juni 1910 in völliger Dunkelheit belassen. Als es um 10 Uhr vormittags herausgenommen wurde, machte es einen vollkommen normalen Eindruck. Es wurde nun bis nachmittags um 4 Uhr ins diffuse Tageslicht gestellt. Durch 2 Minuten im Verlauf des Nachmittags war es in die Sonne gebracht worden. Um 6 Uhr abends wurde das Tier abermals gezeichnet, und Fig. *b* zeigt nun die oben beschriebene Schwellung des Kopfes und die ganz charakteristische Stellung der Ohren. Um 8 Uhr abends ging das Tier ein.



a. *b.*

Fig. 1.

Auch die subakut verlaufenden Fälle zeigen ausgesprochenste Lichtscheu, auch hier verkleben die Lider manchmal völlig. Sie können wenige Minuten nachher einen normalen Eindruck hervorrufen, bleiben aber oft konstant verklebt. In den ersten Stunden der Belichtung ist die Rötung der Ohren usw. eine sehr intensive. Sie macht später einer mehr bläulichen Färbung Platz. Im Verlaufe eines oder auch mehrerer Tage werden nun die Tiere sehr matt und hinfällig und verenden gewöhnlich ohne bes. charakteristische Erscheinungen. Die Ödeme verschwinden nicht, das gedunsene Aussehen der Tiere bleibt bis zum Tode erhalten.

Die Untersuchung der inneren Organe ergibt denselben Befund wie bei der akuten Vergiftungsform überall starke Hyperämie.

Zwischen Cutis und Subcutis befindet sich ein in manchen Fällen starkes Ödem, das das 4 bis 6fache des normalen

Cutisquerschnittes betragen kann, gewöhnlich mit ziemlich reichlicher Leukocytheneinwanderung. Während die letzteren gegen die Cutis zu allmählich seltener werden, grenzt sie das Ödem gegen die Muskulatur zu öfters scharf ab in Form eines mächtigen Walles polynucleärer Leukocyten. Doch kann nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, ob diese Leukocytenemigration nicht die Folge der Injektion an sich darstellt.

Seziert man die Mäuse unmittelbar nach dem Verenden oder dekapitiert man dieselben zwecks Blutentnahme, so wird nur eine minimale Blutmenge erhalten, kaum ausreichend, um damit in starker Verdünnung photodynamische Versuche anzustellen. Diese Blutarmut steht offenbar in Zusammenhang mit dem Ödem, sowie mit der Hyperämie der inneren Organe.

Chronische Form.

Die chronischen Schädigungen der Versuchstiere sind bei Sensibilisierungen durch Hämatoporphyrin relativ selten zu beobachten. Dies rührt davon her, daß es schwierig ist, erkrankte Tiere vor dem Verenden zu bewahren, anderseits jedoch den Belichtungsprozeß doch so intensiv zu gestalten, um das Zustandekommen bleibender Veränderungen zu ermöglichen. Bei einigermaßen intensiver Lichteinwirkung auf „Hämatoporphyrintiere" tritt, wie aus den obigen Daten hervorgeht, leicht der Tod ein. Wird gar zu schwach belichtet, z. B. im Winter im diffusen Tageslichte, im Frühjahr oder im Sommer im halbdunkeln Raume, so kommt es wohl zu leichter Hyperämie der Ohren sowie zu sonstigen schwachen Reizerscheinungen. Doch gehen in solchen Fällen die Symptome gewöhnlich zurück, scheinbar ohne irgendwelche Schädigungen zu hinterlassen.

Um chronische Veränderungen zu erzielen, ist es am zweckmäßigsten, erkrankte Tiere, die einen schwer affizierten Eindruck machen, stark gedunsen erscheinen und deren Ohren die charakteristischen Erscheinungen sehr deutlich zeigen, aus dem helleren Lichte zu entfernen und nun ganz im Dunkeln oder noch besser im Dämmerlicht zu belassen. Es handelt sich demnach um subakute Fälle, die aus dem Bereiche der stärkeren Belichtung entfernt werden, wenn die Symptome voll entwickelt sind.

Unter diesen Umständen bilden sich dann öfters die gleich zu besprechenden Veränderungen aus, doch möchte ich bemerken, daß man die Entstehung dieser chronischen Form nicht so in der Hand hat, wie die der akuten, resp. subakuten, wie aus den angeführten Gründen hervorgeht.

In den Versuchen, in denen die Erzielung der chronischen Form gelingt, gehen nun die starken Schwellungen des ganzen Körpers langsam zurück, die Rötung der Ohren usw. läßt nach, auch verschwindet die abnorme Stellung der Ohrmuscheln. Betrachtet man nun die Ohren genauer, so sieht man die Gefäße in manchen Bezirken stark injiziert, in manchen ganz blutleer. Das Blut läßt sich durch Druck nicht aus den Gefäßen ausdrücken, es sind demnach Thrombosen entstanden. Im Verlauf einiger Tage oder in noch kürzerer Zeit verfärben sich die Ohren, sie werden bräunlich und fühlen sich pergamentartig an. Es ist trockene Nekrose eingetreten, die scharf abgegrenzt mehr oder minder große Teile der Ohrmuschel ergreifen kann. Das nekrotische Stück wird abgestoßen. In einem Versuche (S. 299) lösten sich die Ohrmuscheln fast ganz ab.

Neben der Nekrose der Ohren beobachtete ich öfters Veränderungen in der Umgebung der Augen. Im Laufe der subakuten Form kommt es, wie oben beschrieben wurde, häufig zu Verklebung der Augenlider. Sie sind geschlossen und durch starke Sekretmengen aneinander geklebt. Nach einigen Tagen konnten die Tiere, die nun im Dunkeln verblieben, die Augen wieder öffnen. Nun gehen die Cilien aus, ebenso werden die Haare in der Umgebung der Augen schütter, um nach einigen Tagen ganz auszufallen. Die Tiere zeigen nun um die Augen herum eine ringförmige haarlose Stelle im Ausmaße von 2 bis 3 mm, die monatelang unverändert bleibt. Auch an den Extremitäten treten haarlose Stellen, jedoch nicht sehr ausgesprochen auf.

In dem besonders charakteristischen Falle (Versuch 1, S. 299) schloß sich an die eben geschilderten Symptome eine Enthaarung, die langsam den ganzen Rücken sowie die Extremitäten des Tieres ergriff. In geringerem Maße wurde Haarausfall mit und ohne Hautschorfe auch bei anderen chronischen Fällen beobachtet, doch muß bemerkt werden, daß derartige Vorkommnisse sich in vereinzelten Fällen auch nach anderen Injektionen einstellen. Hier sei auch an die von Lode und seinen

Schülern beschriebene Enthaarung von Meerschweinchen hingewiesen, die nach Maisgenuß dem Lichte ausgesetzt worden waren.[1])

Nachstehend seien einige der zahlreichen Versuchsprotokolle wiedergegeben. Bei der Wiedergabe der Versuche sind weniger die genauen Schilderungen der Symptome, die bereits in den vorhergehenden Seiten besprochen wurden, als die Angaben über verabreichte Dosen, über die Zeit, die zwischen Injektion und Belichtung verstreicht usw., beabsichtigt, um eine eventuelle Wiederholung der Versuche zu ermöglichen.

Versuch 1.

Der hier mitgeteilte Versuch zeigt, wie sich alle drei Krankheitsformen lediglich in Abhängigkeit von der Belichtung bei sonst ganz gleichmäßig behandelten Tieren entwickeln können. Es sei auch darauf hingewiesen, daß in diesem Falle die Belichtung erst 4 Tage nach der Injektion erfolgte. Die in der Sonne in 1 Stunde verendete Maus zeigt das akuteste, von mir bisher beobachtete Bild dieser Vergiftungsform.

3 weiße Mäuse von etwa 12 g erhalten am 8. VII. 1910 je 0,002 Hämatoporphyrin. Sie werden bis zum 12. VII. 1910 im Dunkeln belassen, am 12. VII. sind sie ganz munter. Das eine Tier (I) wird nun unter Kühlung der Sonne, das zweite dem hellen, diffusen Tageslicht vor einem Ostfenster, das dritte in der Mitte des Laboratoriums in einem dickwandigen Glasgefäße dem Tageslicht exponiert. Beginn der Belichtung bei I und II um 10^h 25′, bei III um 10^h.

Zeit	I	II	III
10^h 30′	sehr heftiges Kratzen usw., Ohren beginnen sich zu röten	Ohren leicht gerötet	nichts zu bemerken
10^h 45′	sehr heftige Erscheinungen, Ohren intensiv rot usw.	Ohren rot, Kratzen	do.
11^h	do.	do.	Kratzen, Ohren leicht gerötet
11^h 30′	verendet	etwas gedunsen, rötliche Ohren	do.
1^h	—	sehr gedunsen, Ohren nach vorne gerichtet	rote Ohren
3^h		do., sehr matt	rote Ohren, stark gedunsen
4^h 30′		moribund	do.
4^h 45′		verendet	do.

[1]) Wiener klin. Wochenschr. 1910.

Nr. III bleibt im schwachen diffusen Lichte am 13. VII. sehr gedunsen, Ohren nach vorne. 14. VII. Dasselbe, aus den stark injizierten Gefäßen läßt sich kein Blut auspressen (Thrombose). 15. VII. Dasselbe, Augen verklebt, das Tier wird nun ins Dunkle gebracht.

16. VII. Lebt im Dunkeln, das linke Ohr ist in seinem äußeren scharf abgesetzten Drittel ganz pergamentartig, aus den strotzend gefüllten Gefäßen läßt sich kein Blut auspressen. In den anderen Teilen des Ohres ist das Blut leicht auspreßbar. Am rechten Ohr dasselbe, die Ohren nicht mehr nach vorne gerichtet. Augen offen. Das Tier nur mäßig gedunsen.

17. VII. Ähnlich wie am vorigen Tag, weniger gedunsen, um die Augen bildet sich ein haarloser Ring.

30. VII. Der pergamentartige Teil der Ohren abgefallen, haarloser Ring um die Augen, sonst normal.

Akute Fälle.

Versuch 2.

Weiße Maus, 20 g, erhält am 9. XII. 1909 um 2^h 20′ 0,01 g Hämatoporphyrin subcutan. Das Tier ist um 3^h 20′ anscheinend ganz normal. Es wird nun dem Bogenlichte exponiert. 3^h 30′. Heftiges Kratzen usw. Lichtscheu, die Symptome dauern an. Um 4^h 15′ ist das Tier sehr matt, es verendet um 5^h 25′ unter tetanischen Erscheinungen. Gallenblase und Duodenum sind schwappend gefüllt mit einer roten Flüssigkeit, die sich als stark hämatoporphyrinhaltig erweist. Innere Organe hyperämisch. Haut nicht untersucht. Das Tier machte intra vitam keinen sehr gedunsenen Eindruck.

Versuch 3.

Weiße Maus, 12 g, erhält am 24. VI. 1910 um 4^h 15′ 0,0012 g Hämatoporphyrin subcutan. Am 25. VI. früh ganz normal, Ohren blaß. Um 10^h 07′ wird das Tier im Bogenlicht belichtet. 10^h 10′ heftigstes Kratzen und Wälzen, die Ohren stärker injiziert, 10^h 17′ heftigstes Kratzen und Wälzen, Lichtscheu, schwach gedunsen. 10^h 27′ dasselbe, Ohren intensiv gerötet. 11^h Ohren etwas weniger rot, beginnen sich nach vorn zu richten, etwas gedunsen, die Augen scheinen tief zu liegen.

11^h 40′ das Tier ist dyspnoisch, sehr aufgeregt, zeitweilig krampfartige Bewegungen.

11^h 45′ dasselbe, 12^h läuft sehr unbeholfen im Belichtungsgefäße herum, bleibt, auf den Rücken gelegt, sekundenlang liegen. 12^h 08′ liegt auf der Seite, 12^h 10′ verendet. Die gleich lange belichtete normale Kontrollmaus war ganz ungeschädigt.

Makroskopischer Befund: Leichtes Ödem der Körperhaut, Blutfülle der inneren Organe.

Mikroskopischer Befund: Entzündung der Subcutis mit Ödem zwischen Subcutis und Muskelschicht reichliche Leukocytenauswanderung, Ödem zwischen Subcutis und Muskelschicht des Ohransatzes. Hyperämie der inneren, sonst intakten Organe, keine Ödeme derselben.

Die Nebeneinanderstellung dieser Versuche ist insofern von Interesse, da in dem Versuch 2 die nicht ganz 6fache Menge gegeben wurde wie in Versuch 3. Trotzdem noch dazu in Versuch 3 eine viel längere Zeit zwischen Belichtung und Injektion verstrichen war (1 Stunde gegen 18 Stunden), ist weder der Verlauf bei Nr. II rascher, noch sind die Symptome intensiver. Die untere Grenze war demnach schon bei Nr. III erreicht worden.

Versuch 4.

Weiße Maus, 20 g, erhält am 8. III. 1910 0,05 g Hämatoporphyrinchlorhydrat, am 12. III. belichtet (Bogenlicht). Nach 1 Stunde quietscht das Tier auf Berührung, manchmal auch spontan. Während die Kontrollmaus bei Anschlagen an das Gefäß zusammenzuckt, rührt sich das injizierte Tier nicht, springt aber krampfhaft auf, wenn es berührt wird. Das Tier scheint lichtscheu, sitzt unbeweglich da. Ins Dunkle gebracht, scheint es ganz normal, trachtet zu entkommen. Verendet nach 3stündiger Belichtung. Kontrolle vollkommen normal.

Versuch 5.

Weiße Maus, 25 g, 0,003 g Hämatoporphyrin in 1 ccm 10^h 45′, 13. IV. 1910. Um 10^h 50′ in die Sonne. In demselben Momente, wie das Tier ins Licht gebracht wird, quietscht es auf, dann sofort Kratzen und anscheinend Übelbefinden, 11^h 10′ starke Dyspnoe, 11^h 15′ ein Auge verklebt, Ohren und Extremitäten intensiv gerötet, 11^h 45′ sehr matt; da die Sonne sich versteckt, ins Bogenlicht. 12^h Rückenlage. 12^h 30′ verendet.

In diesen Versuchen ist eine nicht immer beobachtete Schmerzempfindlichkeit der Tiere beobachtet worden.

Subakute Fälle.

Versuch 1.

Weiße Maus, 15 g, erhält 0,002 g Hämatoporphyrin am 8. VII. 1910. Am 10. VII. 1910 belichtet, in der Mitte des Laboratoriums in einem dickwandigen Glasgefäße um 11^h 15′. Sonniger Tag. 11^h 45′ Ohren leicht gerötet, 12^h 15′ Ohren stark gerötet, beginnt gedunsen zu erscheinen. 1^h dasselbe. Während der ganzen Zeit zeitweilig heftiges Kratzen. 4^h dasselbe Bild, Ohren nach vorn gerichtet.

11. VII. Das Tier ist sehr stark gedunsen, Ohren nach vorn gerichtet, Augen verklebt, etwas matt.

12. VII. Dasselbe, sehr gedunsen und matt, abends moribund.

13. VII. Tod gefunden.

Versuch 2.

Weiße Maus, 16 g, erhält am 13. IV. 1910 0,003 g Hämatoporphyrin, hierauf wird sie in der Mitte eines nach Osten gerichteten Zimmers in

ein sehr dickwandiges, oben offenes Glasgefäß gebracht. Mäßige Erscheinungen, Kratzen usw. Am Abend sind die Ohren stark gerötet und nach vorn gerichtet, das Tier erscheint ziemlich gedunsen. Am nächsten Morgen derselbe Befund, wird nun an ein Ostfenster im hellen diffusen Tageslicht hinter Doppelfenstern in ein dünnwandiges, oben offenes Becherglas gebracht. Die Erscheinungen nehmen zu, das Tier erscheint immer unförmlicher und matter. Um $5^h\ 30'$ abends geht das Tier ein.

Die mikroskopische Untersuchung ergab außer Ödem mit reichlicher Leukocyteneinwanderung sehr starke Hyperämie der inneren Organe, keine Ödeme derselben.

Chronische Fälle.

Versuch 1.

Weiße Maus, 20 g, erhält am 28. V. 1910 0,002 g Hämatoporphyrin, subcutan. Im Dunkeln gehalten bis zum 2. VI. abends, 1 Stunde Bogenlicht, sehr bald Kratzen, rote Ohren usw., dann im diffusen Lichte in der Mitte des Laboratoriums gehalten. 3. VI. ziemlich gedunsen, Ohren nach vorn gerichtet.

6. VI. Nicht stark gedunsen, Ohren pergamentartig, gefaltet, rötlich-braun, auf Wegschneiden eines Stückes der Ohrmuschel erfolgt keine Blutung (zur Kontrolle wird einer kleinen Maus mit ganz blassen Ohren an derselben Stelle ein Stück der Ohrmuschel abgeschnitten. Die Blutung ist deutlich wahrnehmbar). Augen ganz verklebt, wird im Halbdunkel gehalten.

8. VI. Sehr munter, kaum mehr so gedunsen, das eingeschnittene Ohr zeigt nicht die Spur einer Blutung, das andere ganz pergamentartig. Augen ganz verklebt.

11. VI. Munter, Ohren ganz braun, pergamentartig, Augen offen, Lider geschwollen, haarlos, der Schwanz zeigt Hautabschülferung.

12. VI. Munter, Ohren unverändert, Augen offen, rings um die Augen herum und im Umkreise von etwa 2 mm die Haare ausgefallen.

13. VI. Die Ohren beginnen sich nahe ihrem Ursprunge in scharf abgegrenzter Linie abzutrennen.

15. VI. Das linke Ohrläppchen hat sich fast ganz abgelöst; durch ganz leichten Zug, den das Tier offenbar nicht empfindet, gelingt es, das ganze Ohrläppchen an der Ansatzstelle abzuziehen. Keine Blutung.

18. VI. Das rechte Ohrläppchen abgefallen.

23. VI. Der Rücken beginnt haarlos zu werden, sonst wie oben.

Im Laufe des Juli steigert sich der Haarausfall, zum Teil mit Hautschorfen, so daß Anfang August der ganze Rücken sowie die hinteren Extremitäten vollkommen enthaart waren.

1. VIII. Am Leben, wie früher.

Versuch 2.

Weiße Maus, 22 g, erhält 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan am 30. V. 1910. Belichtet im diffusen Lichte in der Mitte des Zimmers,

zeigt deutliche Symptome der subakuten Vergiftung. Am 2. VI. ins Halbdunkle gestellt, wieder beobachtet am 5. VI. 1910. Das allgemeine Ödem ist im Rückgang, die Enden beider Ohren bräunlich, pergamentartig, jedoch nicht abgefallen, wird getötet. Die mikroskopische Untersuchung ergab Nekrose des Endes des Ohres, in der Tiefe Auswanderung von Leukocyten, Ödem gegen die Grenze der Nekrose, Demarkation.

Vgl. ferner den chronischen Fall auf S. 296, Nr. III.

Vorbelichtungsversuch.

Ebenso wie bei der Sensibilisation von Paramaecien durch Hämatoporphyrin ist auch hier der Nachweis zu führen, daß es sich in den mitgeteilten Versuchen um eine optische Sensibilisation handelt.

Daß die von uns gewählte Belichtungsart die Mäuse nicht schädigte, wurde bei den Versuchen in der Sonne und im Bogenlichte schon hervorgehoben. Nur muß bei den Versuchen im Sonnenlichte für genügende Abhaltung der Wärmestrahlen gesorgt werden. Daß mehr oder minder helles diffuses Tageslicht weiße Mäuse nicht schädigt, braucht nicht erst besonders bemerkt zu werden.

Es war von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß aus dem Farbstoff durch die Belichtung ein giftiger Körper abgespalten würde, denn die Bestrahlung, die der schon injizierte Farbstoff im Tierkörper auch bei starken Lichtquellen erfährt, ist eine sehr geringe. Bei den Versuchen im diffusen Tageslichte ist dies hier überhaupt nicht in Betracht zu ziehen. Es ließ sich nun auch ohne weiteres zeigen, daß Hämatoporphyrin durch starke Vorbelichtung für die Mäuse nicht giftig wird; durch einige Versuche, in denen tagelang in der Sonne vorbelichtete Lösungen des Farbstoffes verwendet wurden, war es sehr leicht auszuschließen, daß unsere Befunde auf eine Substanz zurückzuführen seien, die erst im Lichte aus dem Hämatoporphyrin entsteht. Nachstehend seien zwei der zahlreichen Versuche wiedergegeben. Wie schon bemerkt, nimmt die Lösung des Hämatoporphyrins in der Sonne eine mehr bräunliche Färbung an.

Versuch 1.

Am 29. V. 1910 wird eine Lösung von 0,02 g Hämatoporphyrin in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Wasserkühlung in einer dünnwandigen Eprouvette in die Sonne gestellt und von 8^h vorm. bis abends belassen.

Am 30. V. ist die Lösung bis 10^h vormittags in der Sonne. Eine weiße Maus von 18 g erhält 1 ccm der Lösung subcutan. Um 4^h nachmittags ist das bisher im Dunkeln belassene Tier ganz normal. Es wird nun ins helle diffuse Tageslicht gestellt, ist am Abend stark gedunsen und wird am 31. V. 1910 tot gefunden.

Versuch 2.

Eine Lösung von 0,02 g Hämatoporphyrin in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung wird durch 2 Tage, wie in Versuch 1, dem Sonnenlichte ausgesetzt, hierauf davon am 27. V. 1910 0,5 ccm einer weißen Maus (15 g) um 10^h vorm. injiziert. Am 28. V. ist das im Dunkeln belassene Tier vollkommen normal. Es wird um 10^h ins helle diffuse Licht gestellt, ist um 1^h stark gedunsen und sehr matt. Um 3^h nachmittags wird das Tier tot gefunden.

Es wird demnach durch Vorbelichtung das Hämatoporphyrin weder giftig, noch wird seine sensibilisierende Kraft merkbar beeinträchtigt.

In welchen Strahlen wirkt Hämatoporphyrin sensibilisierend auf weiße Mäuse?

Nunmehr war die Frage zu beantworten, ob die Wirkung des Lichtes auf „Hämatoporphyrintiere" an bestimmte Strahlen des Spektrums gebunden sei, und welche diese seien. Um dies zu untersuchen, wurden die Tiere in Kästchen gesetzt, die nur von einer Seite Licht erhielten; die Lichtstrahlen passierten eine Leyboldsche Glascuvette, in der sich die absorbierenden Flüssigkeiten in 1 cm dicker Schichte befanden. Die Versuche wurden im diffusen Tageslichte ausgeführt.

Die nachstehend mitgeteilten Versuche ergeben, daß in erster Linie die Strahlen um 500 $\mu\mu$ wirksam sind, daß also dieser Blutfarbstoff die weißen Mäuse auf dieselbe Weise wie die Paramaecien optisch sensibilisiert.

Versuch 1.

2 weiße Mäuse von etwa 20 g erhalten je 0,5 ccm einer Lösung von 0,035 g Hämatoporphyrin in 5 ccm physiolog. NaCl-Lösung. Das eine Tier befindet sich hinter einer 1 cm dicken Schicht von 5%igem Kaliummonochromat (Nr. I), das andere hinter einer ebensolchen Schicht von Kaliumbichromat (Nr. II). Die Injektion beider Tiere erfolgt um $9^h 45'$, die Belichtung um $10^h 15'$. Die Ohren beider Tiere waren bei Beginn der Belichtung ganz blaß. Der weitere Verlauf geht aus der Tabelle hervor. Die Belichtung erfolgte im hellen diffusen Tageslichte eines sonnigen Tages. Der Strahlenfilter in Nr. I läßt hauptsächlich langwellige Strahlen bis 548 $\mu\mu$, der in Nr. II bis etwa 493 $\mu\mu$ passieren.

Zeit	Nr. I	Nr. II
10^h 15′ (Beginn der Belichtung)		
10^h 35′	kratzt sich zeitweise, Ohren blaß	kratzt sich, Ohren rot
10^h 46′	normal, Ohren blaß	kratzt sich; Ohren stark gerötet
11^h 31′	„ „ „	Ohren sehr intensiv rot
12^h	„ „ „	„ „ „ „
3^h 30′	„ „ „	etwas gedunsen, Ohren sehr rot
6^h 30′	„ „ „	stark gedunsen, Ohren sehr rot, Extremitäten stark gerötet, Augen geschlossen

Am nächsten Morgen ist Nr. I normal, Nr. II ganz gedunsen, die Ohren bläulich-rot, nach vorn gerichtet. Beide Tiere werden, um nachzuweisen, daß auch Nr. I sensibilisiert war, ohne Lichtfilter in demselben Becherglase auf dem Laboratoriumstische belassen. Nr. I zeigt nun alle Erscheinungen der subakuten Fälle, ist am Abend ganz gedunsen usw. Nr. II wird abends tot gefunden.

Aus dem eben mitgeteilten Versuche folgt, daß die Strahlen um 500 $\mu\mu$ wirksam sind. Dementsprechend gewährte eine konzentrierte Lösung von Kupfersulfat, die die langwelligen Strahlen bis etwa 550 $\mu\mu$ abhält, gar keinen Schutz gegen die Belichtung, wie die nachstehenden Versuche zeigen.

Versuch.

2 weiße Mäuse von je 20 g erhalten am 16. V. 1910 je 0,002 g Hämatoporphyrin. Am 17. V. werden die Tiere exponiert, und zwar ein Tier hinter einer 1 cm dicken Schicht von 5%igem Kaliumbichromat (Nr. I), das zweite hinter einer 1 cm dicken Schicht von konzentrierter Kupfersulfatlösung. Die Belichtung erfolgte im diffusen Tageslichte; heller, sonniger Tag.

Zeit	Nr. I	Nr. II
11^h (Beginn der Belichtung)		
1^h	normal	Ohren gerötet
6^h	„	Ohren gerötet, nach vorn gerichtet

Versuch.

2 Mäuse von 12 g erhalten je 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan am 18. V. 1910 um 11^h. Beginn der Exposition $^1/_2$ Stunde nach der

Injektion. Heller, sonniger Tag, Belichtung vor einem Ostfenster, diffuses Licht. Nr. I hinter 5%igem doppeltchromsaurem Kali, Nr. II hinter konzentrierter Kupfersulfatlösung.

Zeit	Nr. I	Nr. II
18. V., 11h 30′ (Beginn d. Exposition)		
12h 30′	munter, blasse Ohren	matt, rote Ohren
12h 45′	„ „ „	„ „ „
7h	„ „ „ normal, sieht mit weit geöffneten Augen ins Licht	matt, gedunsen; Ohren stark gerötet; sitzt vom Licht abgewendet, dreht es sich um, so schließt es die Augen
19. V., 9h	normal	rote Ohren, gedunsen
12h	„	sehr matt, rote Ohren, gedunsen
4h	„	sehr matt und gedunsen, bleibt kurze Zeit auf dem Rücken liegen; Versuch abgebrochen

Versuch.

2 weiße Mäuse von 15 g erhalten je 0,002 g Hämatoporphyrin am 28. V. 1910. Ganz normal am 30. V. 1910. Dann die eine im diffusen Tageslicht hinter 0,1%igem Lithioncarmin (Nr. I), die andere hinter Pikrinsäure + Kupferacetat (Nr. II) im diffusen Lichte, erst trüb, dann Sonne.

Zeit	Nr. I	Nr. II
30. V., 9h 40′ (Beginn der Belichtung)		
12h	normal	matt, rote Ohren
3h	„	„ „ „
4h	„	ziemlich matt
5h	„	gedunsen, matt
I. VI.	„	dasselbe
	(nicht weiter beobachtet)	

Der bei Nr. I verwendete Lichtfilter läßt Strahlen bis etwa 635 $\mu\mu$, Filter Nr. II die Strahlen von etwa 580 bis 490 $\mu\mu$ passieren.

Es geht aus diesen Versuchen wie aus den obigen die überwiegende Wirksamkeit der Strahlen um 500 $\mu\mu$ hervor. Daneben muß berücksichtigt werden, daß die ultravioletten Strahlen in unseren Versuchsanordnungen zum größten Teile ausgeschaltet waren, abgesehen wohl von den Versuchen im hellen diffusen Tageslicht, in denen das Licht auch von oben Zutritt zu den Tieren hatte, und vielleicht im Sonnenlichte,

wo nur ganz dünnwandige Glasgefäße verwendet wurden. In den Versuchen im Bogenlichte kann eine Wirkung der nicht sichtbaren chemischen Strahlen des Spektrums nicht angenommen werden, da die Strahlen in dem benutzten Apparate eine Reihe von Glasplatten sowie eine dicke Glaslinse passierten.

Es muß demnach die Frage, ob nicht, abgesehen von den grünen Strahlen, auch den ultravioletten eine Wirkung auf Hämatoporphyrintiere zuzuschreiben ist, zurzeit als unentschieden bezeichnet werden.

Die Tatsache, daß hauptsächlich die grünen Strahlen wirksam sind, steht auch mit der Beobachtung in Übereinstimmung, daß ein Bogenlicht, das an diesen Strahlen relativ arm ist, eher schwächer wirkt als das helle diffuse Tageslicht trüber Sommertage. Allerdings kann es sich in dem nachstehend mitgeteilten Versuche auch um Wirkung der ultravioletten Strahlen des Spektrums gehandelt haben, da die im diffusen Tageslichte exponierte Maus in einem unbedeckten Becherglase sich befand, während bei dem Tiere, das dem Bogenlichte exponiert war, die Wirkung dieser Strahlen so gut wie ausgeschlossen war.

Versuch.

2 weiße Mäuse erhalten je 0,002 g Hämatoporphyrin am 8. VII. 1910 abends. Am 9. VII. werden die Tiere, immer mit den entsprechenden Kontrollen, belichtet, und zwar die eine Maus (Nr. I, 14 g) im diffusen Tageslicht eines trüben Tages vor dem Ostfenster, die andere (Nr. II, 13 g) im Bogenlichte.

Zeit	Nr. I	Nr. II
	Beginn der Belichtung $9^h\,30'$	Beginn der Belichtung $9^h\,40'$
$9^h\,45'$	Ohren gerötet, scheint gedunsen, Augen geschlossen, Kratzen	Ohren stark gerötet; scheint gedunsen, heftiges Kratzen
$10^h\,14'$	dasselbe, deutlicher	dasselbe, deutlicher
$10^h\,30'$	etwas matt, Ohren etwas nach vorn gerichtet	Ohren vielleicht nach vorn gerichtet
$10^h\,45'$	dasselbe	dasselbe
$11^h\,30'$	„	quietscht bei Berührung
12^h	Ohren blaß, äußerst matt	Ohren rot, ziemlich matt, jedoch nicht so wie Nr. I
$12^h\,37'$	verendet	Ohren blaß, läßt den Kopf sinken, wird getötet

Es frägt sich nun, woran in den akuten und subakuten Fällen die Mäuse im Licht zugrunde gehen. Bei dieser Fragestellung drängt sich die Analogie auf, die zwischen dem Verbrennungstode und dem hier beobachteten Krankheitsbilde besteht. Besonders jene Fälle sind hier zum Vergleiche heranzuziehen, in denen relativ geringfügige Brandwunden zum Tode führten. Auch in unseren Fällen ist als primäre Schädigung der Hautreiz anzusehen, und zwar meist in sehr großem, fast die ganze Oberfläche betreffendem Ausmaße. Ob und inwiefern wir die Hautaffektion als Todesursache bezeichnen können, wird noch schwerer zu beantworten sein wie bei der Verbrennung: die Sektion der inneren Organe läßt nur auf agonales Versagen der rechten Herzhälfte schließen.

Jedenfalls ist auch, wie es bei der Verbrennung früher angenommen wurde, an die Möglichkeit einer Chokwirkung zu denken, der die Tiere, die am ganzen Körper von intensivem Jucken gequält sind, erliegen.

Ferner muß betont werden, daß die Entstehung von Giften im Tierkörper unter der sensibilisierenden Wirkung des Hämatoporphyrins im Lichte, ebenso wie es u. a. Hermann Pfeiffer[1]) für den Verbrennungstod auf Grund seiner schönen Versuche angenommen hat, auch in unserem Falle möglich ist. Auch die Möglichkeit einer Bluteindickung besteht, besonders in den subakuten Fällen, ebenso wie beim Verbrennungstode. Ich behalte mir vor, über diese Fragen nochmals zu berichten.

Was nun die Entstehung des Krankheitsbildes betrifft, so scheint die Schädigung der peripheren Gefäße das Primäre zu sein; dafür sprechen die diffuse Rötung der Ohren und die Ödeme. Das Fehlen von Ascites und Ödemen der inneren Organe lassen es ausgeschlossen erscheinen, daß es sich hier um Stauungsödem gehandelt hat.

Es ist, wie ich schon früher betonte,[2]) zur Beurteilung von Sensibilisationskrankheiten — d. h. von Affektionen, die unter Mitwirkung derartiger Sensibilisatoren entstehen — sehr wichtig, daß nicht nur Hautaffektionen durch solche Körper im Lichte hervorgerufen werden können, sondern daß mehr oder minder akut verlaufende Allgemeinerkrankungen durch

[1]) Virchows Archiv 180, 367, 1905.

[2]) Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 52.

dieselben verursacht werden können. Ganz ähnliche Erscheinungen sehen wir bei der Buchweizenkrankheit, wo die Tiere durch Buchweizenpflanzen oder -körner sensibilisiert sind und neben Hautaffektionen schwere allgemeine Erscheinungen im Lichte darbieten. Zu denselben Resultaten gelangte W. Öhmke unter der Leitung von N. Zuntz[1]). Eine andere Krankheit, die ebenfalls mit dem Lichte in Beziehung zu bringen ist, die Pellagra, zeigt neben oft wenig hervortretenden Hauterscheinungen eine Reihe typischer Störungen seitens des Verdauungstraktes und des Zentralnervensystems. Es wird eine der wichtigsten Aufgaben der Pellagraforschung sein, zu untersuchen, inwieweit diese Symptome der Pellagra in Abhängigkeit von der Belichtung stehen oder nicht.

Zu unserer speziellen Hämatoporphyrinsensibilisierung zurückkehrend, müssen wir die Frage entscheiden, ob der Farbstoff noch im Blute kreisen muß, um das Zustandekommen des „Lichttodes" zu ermöglichen. Ist dies der Fall, so war es nicht ausgeschlossen, daß die Blutkörperchen beim Durchströmen der peripheren Bezirke durch die photodynamische Wirkung des Hämatoporphyrins im Lichte zerstört wurden, und daß hierdurch die Giftwirkung überhaupt zu erklären war. Sehr wahrscheinlich war dieser Schluß nicht, weil die Belichtung innerhalb der Blutbahn hierbei eine sehr geringe sein mußte. Dies gilt besonders für die Versuche im diffusen Tageslichte, abgesehen davon finden wir bei Giften, die neben Allgemeinwirkung auch auf isolierte Erythrocyten einwirken, die toxische Wirkung gewöhnlich unabhängig von der Blutgiftkomponente sich entfalten.

Wie zu erwarten war, stellte es sich heraus, daß das Blut der Hämatoporphyrinmäuse, die im Lichte verendeten, nicht hämolytisch war. Ebenso zeigten mikroskopische Untersuchungen an frischen und gefärbten Präparaten keine Abweichung von der Norm. Doch konnte Hämatoporphyrin trotzdem im Blute sich befinden. Es wurde deshalb in einer Reihe von Versuchen das Blut dem verendenden Tiere durch Dekapitation entnommen, defibriniert, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und hierauf intensiv belichtet. Zur Kontrolle diente das Blut einer normalen Maus, die zugleich mit der injizierten belichtet worden

[1]) Phys. Centralbl. 22, 685, 1909.

war; in einer Reihe von Versuchen wurde sodann den Proben Hämatoporphyrin zugesetzt, um die Menge des Farbstoffes zu bestimmen, die bei dieser Art der Belichtung und Blutverdünnung noch nachweisbar war. Selbstverständlich trat hierbei im Lichte immer Hämolyse auf. Nachstehend seien einige der Versuche mitgeteilt.

Versuch 1.

Weiße Maus, 13 g, erhält am 8. VII. 1910 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan, ist am 9. VII. im Dunkeln normal, hierauf von 10^h vorm. an im Bogenlicht belichtet. Um 12^h 37′ im Sterben, dekapitiert. Das Blut wird aufgefangen, defibriniert und mit physiol. Kochsalzlösung auf etwa 0,3% aufgeschwemmt (3 ccm); mit der zur selben Zeit belichteten Kontrollmaus wird ebenso verfahren. Nach 5 Stunden werden beide Proben, die keine Hämolyse zeigten, im Bogenlichte unter Kühlung belichtet. Nach 2stündiger Exposition im Bogenlichte keine Hämolyse. Nun wird zu je 3 ccm der Blutkörperchenaufschwemmung der Kontrollmaus je 1 ccm (Nr. 1), 0,5 (Nr. 2), 0,3 ccm (Nr. 3) einer Lösung von 0,002 g Hämatoporphyrin in 10 ccm NaCl-Lösung 0,9% zugesetzt und die Proben geteilt, die eine Hälfte im Bogenlichte unter Kühlung belichtet. Es trat in den belichteten Proben nach 20 Min., resp. 30 Min. und $1^1/_2$ Stunden komplette Hämolyse ein; die Dunkelkontrollen negativ. Es hat also der 30. Teil der injizierten Menge hier noch im Lichte gänzlich hämolysierend gewirkt.

Versuch 2.

Weiße Maus, 16 g, erhält am 8. VII. 1910 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan, am 10. VII. im Dunkel normal, hierauf um 10^h 5′ ins Bogenlicht, 1^h im Sterben; wird wie in Versuch 1 behandelt, die gleichfalls belichtete normale Kontrolle ebenso. Die Blutkörperchenaufschwemmungen sind nach 5 Stunden nicht hämolytisch. Sie werden nunmehr $1^1/_2$ Stunden unter steter Kühlung in intensivster Sonne belichtet und werden nicht hämolytisch. Zu je 1 ccm der Kontrolle werden 0,5 (Nr. I), 0,3 (Nr. II), 0,1 ccm (Nr. III) derselben Hämatoporphyrinlösung wie in Versuch 1 zugegeben. In $^3/_4$ Stunden ist Nr. I in der Sonne unter Wasserkühlung komplett hämolysiert, Nr. II sehr deutlich hämolytisch, Nr. III beginnend. Nach 1 Stunde ist auch Nr. II komplett, Nr. III fast komplett hämolysiert.

Versuch 3.

Weiße Maus, 22 g, erhält am 21. II. 1910 0,01 g Hämatoporphyrin-Chlorhydrat subcutan, am 27. II. 1910 im Bogenlicht. Sofort heftiges Kratzen, Lichtscheu usw. Alle Symptome deutlich ausgebildet. Nach $2^1/_4$stündiger Belichtung liegt das Tier auf dem Rücken, wird durch Dekapitation getötet, das Blut defibriniert und mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Nach stundenlanger Belichtung trat keine Hämolyse auf.

Es ist demnach zu einer Zeit, in der die Tiere in hohem Grade sensibilisiert erscheinen, kein Hämatoporphyrin in sensibilisationsfähiger Form im Blute vorhanden. Die Einschränkung, daß derart gebundenes Hämatoporphyrin im Blut sich finden könnte, muß deshalb gemacht werden, weil wir durch die Untersuchungen von Busck[1]) wissen, daß Eiweißkörper imstande sind, die photodynamische Wirkung fluorescierender Substanzen aufzuheben. Doch ist dies unwahrscheinlich, auch in Hinblick auf die Versuche von Neubauer, der im Blute sehr bald nach der Injektion kein Hämatoporphyrin nachweisen konnte.

In einigen Versuchen wurde festgestellt, daß in der Galle sowie im Harn kein Hämatoporphyrin mehr nachweisbar zu sein braucht, wenn auch die Tiere noch sehr deutlich sensibilisiert sind.

Es geht hieraus hervor, daß, wenn wir beim Studium von Krankheiten, die auf Mitwirkung von Sensibilisatoren zurückgeführt werden, weder im Blute, noch in Galle und Harn Sensibilisatoren finden, es sich trotz dieser negativen Befunde um eine durch derartige Substanzen herbeigeführte Affektion handeln kann.

Allem Anscheine nach sind es minimale Reste des Farbstoffes, die im Tierkörper, vielleicht von der Haut, zurückgehalten werden und zur Sensibilisierung ausreichen. Daß eine derartige Bindung des Hämatoporphyrins an Körperzellen möglich ist, zeigen die oben mitgeteilten Daten über das Verhalten der roten Blutkörperchen. Diese Verankerung ist offenbar eine feste, wie die lange nach der Injektion noch bestehende Sensibilisierung erweist.[2])

Nachstehend sei ein derartiger Versuch beschrieben.

Versuch.

Weiße Maus, 20 g, erhält am 8. VII. 1910 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan, sie wird bis zum 17. VII. im Dunkeln belassen und ist nach

[1]) Diese Zeitschr. 1, 425.

[2]) Der Nachweis, daß Sensibilisatoren an die Zellen gebunden werden und auf diese Weise zu wirken vermögen, ist besonders von Wichtigkeit betreffs der Auffassung, daß Chlorophyll auf photodynamische Weise wirkend die Assimilation anregt. Denn auch dieser Farbstoff ist im Chloroplasten „gebunden".

Ablauf dieser Zeit anscheinend vollkommen normal. An diesem Tage um 10^h vorm. wird das Tier ins helle diffuse Tageslicht vor ein Ostfenster gestellt. Sonniger Tag, helle Wolken, das Tier zeigt die typischen Erscheinungen und wird um 5^h abends tot gefunden. Eine zweite, ebenfalls am 8. VII. mit derselben Menge injizierte Maus von 23 g wird am 19. VII. im diffusen Tageslicht exponiert. Abends stark gedunsen, 20. VII. ebenso, 21. VII. tot gefunden. Eine dritte, ebenfalls am 8. VII. 1910 mit 0,002 g injizierte Maus (19 g) wird am 22. VII. im diffusen Tageslichte exponiert, am Abend deutlich gedunsen (trüber Tag), 23. VII. ebenso, 24. VII. gedunsen, Ohren beginnen pergamentartig zu scheinen. Abends tot gefunden.

Es ist demnach hier noch 14 Tage nach der Injektion eine zum Tode führende Sensibilisierung vorhanden gewesen.

Läßt man jedoch eine gar zu lange Zeit zwischen Injektion und Sensibilisierung verstreichen, so kann man die Tiere belichten, sie werden dann nicht mehr geschädigt. Der nachstehend mitgeteilte Versuch läßt noch 18 Tage nach der Injektion eine deutliche Sensibilisierung erkennen, die jedoch das Tier nicht mehr schädigt, nur eben noch erkennbar ist.

Versuch.

3 weiße Mäuse erhalten am 28. V. 1910 je 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan, das eine Tier ist der auf Seite 299 beschriebene erste chronische Fall. Eine zweite Maus (12 g) wird am 6. VI. im diffusen Tageslichte in der Mitte des Laboratoriums belichtet (trüber Tag), am Abend Ohren stark gerötet nach vorn gerichtet, gedunsen, 7. VI. dasselbe ausgeprägter, 8. VI. tot gefunden. Die dritte Maus (15 g) bleibt bis zum 15. VI. im Dunkeln. Sie ist bis zu diesem Tage unverändert und wird nun ins diffuse Tageslicht ganz wie die vorhergehende gebracht (trüber Tag). Am Nachmittag sind die Ohren des um 10^h früh exponierten Tieres ziemlich intensiv gerötet, die Maus etwas gedunsen. 16. VI. Ohren wie am Vortage, nicht mehr gedunsen, 17. VI. und 18. VI. dasselbe, 19. VI. Ohren kaum rötlich, 20. VI. Ohren ganz blaß. Das Tier bleibt von da ab im hellen, diffusen Tageslichte und lebt völlig ungeschädigt nach 2 Monaten, demnach in der Zeit der stärksten Belichtung.

Es folgt hieraus, daß eine noch so intensive Sensibilisierung durch Hämatoporphyrin unschädlich gemacht werden kann, wenn man nur dem Organismus Zeit läßt, sich des Giftes zu entledigen. Allerdings ist es bloß eine — wenn auch sehr wahrscheinliche — Annahme, daß diese Abschwächung in der Sensibilisierung durch die langsame völlige Entfernung des wirksamen Stoffes aus dem Tierkörper herbeigeführt wird. Es könnte sich ja auch um eine andere Art der Entgiftung handeln, daß etwa das noch im

Körper zurückbleibende Hämatoporphyrin in irgend eine nicht mehr sensibilisationsfähige Form übergeführt wird.[1]) Auch eine Bildung von Schutzstoffen ist denkbar.

Doch ist es auch möglich, intensiv sensibilisierte Tiere am Leben zu erhalten, wenn sie nur kurze Zeit dem Lichte exponiert werden. So ist in der Regel eine $^1/_2$stündige Belichtung im Bogenlicht nicht tödlich für weiße Mäuse, die in 2 bis 3 Stunden sicher dieser Bestrahlung erliegen würden. Ähnliche Erfahrungen liegen vor bei Tieren, die im Lichte nach Buchweizenfütterung erkrankten, sowie seitens Raubitscheks an mit Mais gefütterten Tieren.

Verhalten grauer und schwarzer Mäuse.

In mehreren Versuchen wurde das Verhalten zahmer grauer und schwarzer Mäuse untersucht.

Wie die nachstehenden Tabellen ergeben, kann man auch diese Tiere durch Hämatoporphyrin lichtempfindlich machen, allerdings in viel geringerem Maße als weiße Tiere. Eine akute Form wurde nie beobachtet, bei den grauen Mäusen führte die subakute in ganz ungleich längerer Zeit zum Tode als die rasch bei derselben Belichtung erfolgende akute Form der weißen Mäuse. Bei den erheblich stärker pigmentierten, schwarzen Tieren habe ich bisher eine letale Sensibilisierung noch nicht gesehen, wohl aber treten bei diesen wie bei den grauen Tieren leicht Nekrosen usw. im Lichte ein.

Versuch 1.

5 graue und 5 weiße Mäuse erhalten am 12. V. 1910 zwischen $10^h\,10'$ und $10^h\,20'$ je 0,002 g Hämatoporphyrin subcutan.

Um $2^h\,50'$ desselben Tages wird eine graue Maus, 16 g (Gr I), und eine weiße, 12 g (W I), im Bogenlicht belichtet. Gr I zeigt bald heftigsten Juckreiz, rote Schnauze, rote Extremitäten. Nach 2stündiger Belichtung erscheint das Tier sehr gedunsen, aber munter. W I zeigt sofort heftigste Symptome, die dann starker Somnolenz Platz machen. Nach 2stündiger Belichtung verendet das Tier.

13. V. Gr I lebt, wird während des ganzen Tages behandelt wie Gr II, 16 g, das bis dahin im Dunkeln war; ebenso wird eine zweite

[1]) Eine derartige Möglichkeit scheint nach folgenden Befunden möglich zu sein: Im Harne eines an Hydroa aestivale leidenden Mannes war reichlich Hämatoporphyrin vorhanden. Trotzdem sensibilisierte der Harn weder Blutkörperchen noch Paramaecien, wohl aber das aus dem Harne dargestellte Hämatoporphyrin.

weiße Maus, 17 g, die bei der Injektion etwas weniger erhalten hatte, im Bogenlicht belichtet. Das weiße Tier stirbt nach 2stündiger Belichtung unter den charakteristischen Symptomen. Gr I und Gr II werden dann bis abends im diffusen Tageslichte gehalten. Am Abend ist Gr I sehr stark gedunsen und matt, Gr II, das tagsüber deutlichste Symptome aufwies, ebenfalls gedunsen.

14. V. Gr I tot gefunden, Gr II gedunsen, frißt, Gr II und 2 noch unbelichtete graue (Gr III, 20 g, Gr IV, 19 g) und ein weißes (W III), 20 g, im Bogenlicht belichtet. Gr III und Gr IV deutliche Symptome, W III nach 2 Stunden verendet.

15. V. Gr II sehr gedunsen, III und IV etwas gedunsen, Ohren trocken, das vierte weiße Tier belichtet, 1 Stunde Bogenlicht, dann diffus, nicht mehr beobachtet bis zum Morgen des

16. V. Weiß tot gefunden, alle grauen leben, wie oben.

17. V. Gr II nachm. Ohren abgefallen, Gr III ein Ohr fehlt, beide gedunsen, Gr V, 21 g, ins diffuse Licht.

18. V. Gr III tot gefunden, nachm. Gr II tot gefunden, Gr IV matt, Gr V munter, Kratzen.

19. V. Gr IV tot gefunden, Gr V munter.

Gr V wurde sodann ins Dunkle gebracht und erst am 30. V. wieder beobachtet. Das Tier zeigte die charakteristischen Veränderungen der chronischen Form. Die Spitze der Ohrmuscheln war abgefallen, um die Augen herum befindet sich eine haarlose Stelle. Die Extremitäten erscheinen fast haarlos, der Schwanz schülfert sich ab. Das Tier wird nunmehr im diffusen Lichte belassen und lebt noch am 31. VII. 1910.

Versuch 2.

Eine weiße, eine graue und eine schwarze Maus erhalten je 0,002 g Hämatoporphyrin am 5. VII. 1910 11^h vorm. Sie werden nachm. 4^h im Bogenlicht belichtet. Die Weiße verendet um 6^h unter den typischen Erscheinungen. Die Graue und Schwarze zeigen die beginnenden Symptome der subakuten Vergiftung.

6. VII. Grau und Schwarz stark gedunsen, bleiben im hellsten diffusen Lichte.

7. VII. Graue tot gefunden, Schwarze stark gedunsen, Ohren etwas pergamentartig.

8. VII. Schwarz ebenso.

9. VII. Ohren ganz pergamentartig.

10. VII. Teile der Ohren abgefallen.

11. VII. Um die Augen haarloser Ring, das Tier bleibt im diffusen Tageslichte am Leben und zeigt das deutliche Bild der chronischen Form.

1. VIII. Am Leben.

In erster Linie geht aus diesen Versuchen hervor, daß wir das subcutan beigebrachte Hämatoporphyrin als einen ganz ungemein starken Sensibilisator für tierische Organismen zu bezeichnen haben. Dies ergibt sich auch aus den bisher be-

kannt gewordenen Sensibilisationen von Warmblütlern durch fluorescierende Farbstoffe.

Bei den Injektionen von Eosin und Fluorescein-Derivaten [O. Raab[1]), A. Jodlbauer und G. Busck[2])] werden die von mir bei Hämatoporphyringaben beobachteten akuten und subakuten Fälle überhaupt nicht beschrieben. Nur die als „chronisch" bezeichneten werden von diesen Autoren mitgeteilt. Auch in den experimentellen Untersuchungen über Verabreichung von Mais und nachfolgender Belichtung (Horbaczewski, Raubitschek, Lode, Hausmann) sind nicht annähernd so intensive Sensibilisierungen bekannt geworden.

Meines Wissens gibt es nur eine einzige Sensibilisation, die zu ähnlichen Befunden führt, wie das Hämatoporphyrin, es ist die Buchweizenvergiftung, die auch sonst manche Übereinstimmung darbietet. Hier fanden sich stürmische Allgemeinerscheinungen bei den belichteten Tieren, die rasch unter nervösen Erscheinungen verenden können. Auch der bei der Buchweizenerkrankung stets vorhandene exzessive Juckreiz erinnert an die Sensibilisation durch Hämatoporphyrin. Ganz besonders deutlich ist die Übereinstimmung der von G. Fischer[3]) unter Teregs Leitung beschriebenen experimentellen Buchweizenkrankheit bei weißen Mäusen mit den von uns erhaltenen Befunden. Allerdings sind hier nicht annähernd so stürmische Erscheinungen wie in unseren Versuchen beobachtet worden (vgl. W. Ohmke, l. c.).

Durch die mitgeteilten Versuche ist nachgewiesen, daß man mittels Hämatoporphyrin sowohl einzelne Zellen, Infusorien sowie Warmblütler sensibilisieren kann und daß es sich hierbei um eine optische Sensibilisation handelt.

Meiner Ansicht nach muß der sichere Nachweis auch nur eines im Körper vorhandenen Sensibilisators sagen, daß wir bei jeglicher Lichteinwirkung uns darüber klar sein müssen, daß solche Substanzen im Spiel sein können. Erst wenn der Nachweis erbracht werden sollte, daß sicher kein Sensibilisator

[1]) Zeitschr. f. Biol. 44, 16.

[2]) Arch. de pharmakol. et de Ther. 15, 263.

[3]) Diss., Bern 1910.

— es kann sich auch um einen ungefärbten Körper handeln — vorhanden ist, wäre die Behauptung berechtigt, daß das Licht auch ohne solche Sensibilisatoren imstande ist, ähnliche Wirkungen auszulösen, wie wir sie bei Gegenwart von Sensibilisatoren kennen.

Dies gilt ebenso für hochkomplizierte Organismen der Warmblütler, wie für die einzelligen Infusorien und für die roten Blutkörperchen. Daran muß auch angesichts der zweifellos richtigen Angaben von Schmidt-Nielsen, Busck u. a., daß man imstande ist, durch sehr starke Belichtung Hämolyse roter Blutkörperchen zu erzielen, gedacht werden. Es ist immer, vor allem bei den sichtbaren Strahlen des Spektrums, die Möglichkeit im Auge zu behalten, daß ein vom Tierkörper produzierter Sensibilisator wirksam sein kann.[1])

Schon das häufige Vorkommen des Hämatoporphyrins unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen macht diese Betrachtungsart nötig. Garrod[2]) hat gezeigt, daß der Farbstoff wahrscheinlich in jedem Urin des Menschen, wenn auch nur in Spuren vorkommt. Dasselbe Verhalten hat Stockvis[3]) vom Kaninchenharn angegeben.

Auch bei niederen Tieren ist Hämatoporphyrin nachgewiesen worden. Nach Mac Munn[4]) findet sich der Farbstoff in dem Integumente von braungefärbtem Uraster rubens, sowie von Limax und Arion. In bräunlich-rot gefärbten Seesternen fand ihn Mac Munn auch mit einem Begleitfarbstoff Tetronerythrin, auch konnte er den Farbstoff des purpurbraunen Streifens an der Dorsalseite von Lumbricus terrestris mit Hämatoporphyrin identifizieren. Ferner ist unser Pigment in dem Integumente von Jolecurtus strigillatus, bei Ceratotrochus diadema, Flabellum variabile, Fungia symmetrica, Stephanophyllia formosissima und bei Cassiopeja gefunden worden.

[1]) Ebenso ist zu bedenken, daß ein von außen mit der Nahrung eingeführter Sensibilisator die tierischen Gewebe lichtempfindlich machen kann. So nehmen die Herbi- und Omnivoren mit chlorophyllhaltigen Pflanzen photodynamisch wirkende Körper in großer Menge zu sich, und diese könnten dann ebenso wie von den Tieren selbst produzierte Sensibilisatoren wirksam sein.

[2]) l. c.

[3]) l. c.

[4]) Zit. nach Malys Jahresber. 15, 325; 16, 348; 18, 240.

Ein intensiv wirkender Sensibilisator ist demnach ein im Tierreich nicht selten vorkommendes Pigment.

Dies ist von besonderem Interesse in Zusammenhang mit den grundlegenden Arbeiten Hertels[1]), der u. a. die Wirkung verschiedener Strahlen auf die großen Chromatophoren einiger Cephalopoden untersuchte. Durch ultraviolette Strahlen wurden gelbe wie rote Chromatophoren zu Bewegungen veranlaßt. Die blauen Strahlen jedoch wirken nur auf gelbe, die gelben nur auf rote Zellen, entsprechend den von Hertel bestimmten Absorptionsbändern der Zellen. Ebenso konnte Hertel den reich pigmentierten Bauchstrang von Sipunculus nudus durch blaue und gelbe Strahlen erregen, während dies beim nicht pigmentierten Bauchstrange des Regenwurmes nicht gelang. Diese Tatsachen sind ebenso wie die von Steinach[2]) und von Hertel nachgewiesene Einwirkung des Lichtes auf die pigmentierte Iris im Sinne einer Sensibilisation zu deuten und auch so gedeutet worden. Durch den eben hier geführten Nachweis der sensibilisierenden Wirkung eines tierischen Pigments ist die Erklärung eine um so wahrscheinlichere geworden.

Hier sei auch mit Rücksicht darauf, daß die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins auf den Strahlenbezirk um 500 $\mu\mu$ beschränkt ist, auf die ungemein interessanten Arbeiten von C. Hess[3]) über den Lichtsinn verschiedener Tiere hingewiesen.

Für die von Hess untersuchten jungen Fische ließ sich der Nachweis führen, daß die hellste Stelle des Spektrums in der Gegend des Gelbgrüns bis Grün liegt. Auch für Amphioxus haben die gelben und grünen Strahlen des Spektrums die größte Wirkung.

Es ist sehr leicht möglich, daß auch bei diesen Vorgängen optische Sensibilisatoren mitwirken. Ob es sich in diesen speziellen Fällen zum Teil um Hämatoporphyrin handelt, kann derzeit nicht entschieden werden. Denkbar ist es — den Fall einer Sensibilisation überhaupt angenommen — bei dem häufigen Vorkommen des Farbstoffes bei niederen Tieren sehr wohl.

[1]) Zeitschr. f. allgem. Physiol. 6, 44, 1906.

[2]) Pflügers Archiv 87, 38.

[3]) Pflügers Archiv 132, 38, 1910.

Ein gewisser Widerspruch scheint nun zwischen den oben mitgeteilten Versuchen über die deletären Wirkungen injizierter Hämatoporphyrinmengen, mit einer solchen „normalen Sensibilisation" bestehen. Doch läßt sich dies ohne weiteres durch die Annahme erklären, daß der natürlich vorkommende Farbstoff in einer anderen Bindung vorhanden sein kann. Man braucht hier nur an eine engere Verbindung mit dem Organeiweiß zu denken, da wir durch die Versuche von Busck[1]) wissen, daß man durch Zusatz von Serum die photodynamische Wirkung von Sensibilisatoren aufheben, resp. abschwächen kann.

Auch unter pathologischen Verhältnissen scheint die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins von Bedeutung zu sein. Vor allem kommt hier in Betracht eine unter dem Namen Hydroa aestiva bekannte Hauterkrankung, die mit der Belichtung integrierend zusammenhängt und bei deren Auftreten im Harne sehr häufig Hämatoporphyrin nachgewiesen worden ist, das mit den Eruptionen des Exanthems zusammentraf und mit ihm verschwand [vgl. u. a. A. Möller[2]), Linser[3])].

Im Anschluß an meine erste Mitteilung hat Ehrmann[4]) in interessanten Ausführungen darauf hingewiesen, daß es sich bei dieser Krankheit wahrscheinlich um Sensibilisierung durch diesen Farbstoff handelt. Diese Anschauung erscheint gerechtfertigt besonders durch die Arbeit von Perutz[5]). In diesen Versuchen wurden Kaninchen mit Sulfonal gefüttert, um Hämatoporphyrinurie zu erzeugen. In der Tat reagierten diese Kaninchen durch Belichtung mit einer Kromayerschen Lampe mit Hautaffektionen, die beim normalen Kaninchen fehlten.

Neuerdings haben H. Koenigstein und L. Hess bei einem Falle von Lues der Leber und der Milz Hämatoporphyrin im Harne konstatiert. Zugleich wurden bei dem Patienten nekrotische Stellen im Gesichte und an einem Finger nachgewiesen. Die Autoren nehmen an, daß diese Nekrosen, die an Stellen entstanden waren, die dem Lichte ausgesetzt sind, auf die

---

[1]) l. c.
[2]) Der Einfluß des Lichtes auf die Haut. Stuttgart 1900, S. 58.
[3]) Arch. f. Dermatol. u. Syph. 79/80, 1906.
[4]) Arch. f. Dermatol. u. Syph. 97, 83, 1909.
[5]) Wiener klin. Wochenschr. 23, Nr. 4, 1910.

sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins zurückzuführen sind. (Persönl. Mitteil.; erscheint in der Dermatolog. Zeitschr.)

Hämatoporphyrinurie ist noch bei einer Reihe von Krankheiten beschrieben worden [vgl. Neusser[1]), Nakarai[2])]. In diesen Fällen wird speziell darauf zu achten sein, ob auch hier gesteigerte Lichtempfindlichkeit nachzuweisen ist. Dasselbe wird bei Bleivergiftung zu prüfen sein, da die Ausscheidung dieses Farbstoffes zu den häufigsten Erscheinungen dieser Intoxikation zählt [vgl. Stockvis[3]), Nakarai[2])] und besonders als Frühsymptom dieser Vergiftung von Bedeutung ist (Sternberg[4]).

---

[1]) Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 84, Abt. 3, 536, 1881.
[2]) Arch. f. klin. Med. 58, 165, 1897.
[3]) Zeitschr. f. klin. Med. 28, 1, 1895.
[4]) Referat auf dem Kongreß für Gewerbehygiene, Brüssel 1910.

Elektrometrische Reaktionsbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten.

Von

K. A. Hasselbalch.

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts und dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1910.)

Mit 2 Figuren im Text.

Immer von neuem stößt man während der Untersuchung biochemischer Probleme auf die Notwendigkeit, die wahre Reaktion, d. h. die Ionenkonzentration, der Medien kennen zu lernen, in denen sich die untersuchten Prozesse abspielen.

So hat neuerdings S. P. L. Sörensen[1]) dargetan, daß bei reaktionskinetischen Studien über Enzyme die Wasserstoffionenkonzentration eine ähnliche Rolle spielt wie die Versuchstemperatur, und für mehrere enzymatische Spaltungen die optimale Wasserstoffionenkonzentration bestimmt.

So ist ferner die wahre Reaktion der Körperflüssigkeiten schon seit langem Gegenstand eifriger Untersuchungen. Was z. B. das Blut anbelangt, dessen Reaktionsänderungen unter experimentell variierten Versuchsbedingungen zu studieren von Anfang an meine Absicht war, so sind sich bekanntlich alle späteren Untersucher[2]) darin einig, daß seine Reaktion unter normalen Verhältnissen dem Neutralpunkte außerordentlich nahe liegt, was den älteren Anschauungen von der ausgesprochen alkalischen Reaktion des Blutes stark widerspricht.

---

[1]) Enzymstudien II. Diese Zeitschr. 21, 1909.

[2]) R. Höber, Pflügers Archiv 99, 572, 1903. — G. Farkas, ibid. 98, 551, 1903. — P. Fraenckel, ibid. 96, 601, 1903.

Zur Bestimmung der Ionenreaktion von Flüssigkeiten stehen bekanntlich mehrere Methoden zur Verfügung, wovon die wichtigsten die elektrometrische und die colorimetrische sind, die einander an Zuverläßlichkeit fast ebenbürtig sind; jede für sich hat bestimmte Einschränkungen der Brauchbarkeit. Daß die Eigenfarbe der Flüssigkeit die colorimetrische Methode mitunter versagen läßt, so z. B. beim Blut, liegt auf der Hand. Eine Schwierigkeit, die ungefähr gleichmäßig beide Methoden beeinträchtigt, besteht in dem Kohlensäuregehalt der zu messenden Flüssigkeit. Viele Substrate für enzymatische Prozesse sind in der Natur kohlensäurehaltig, mitunter sogar als Folge der enzymatischen Spaltungen; was das Blut betrifft, so findet man bekanntlich darin immer eine gewisse Kohlensäuretension, und zwar verschiedene im arteriellen und im venösen Teile des Kreislaufes. Um die wahre Reaktion einer kohlensäurehaltigen Flüssigkeit kennen zu lernen, muß die Bestimmung — colorimetrisch oder elektrometrisch — in einer Atmosphäre geschehen, die mit der Flüssigkeit im Kohlensäuregleichgewicht steht. Wenn während der Messung Kohlensäure aus der Flüssigkeit entweicht, was in der Regel der Fall sein wird, so wird die gemessene Reaktion in kaum zu bestimmbarem Grade zu alkalisch ausfallen.

Wenn man z. B. eine mit Kohlensäure gesättigte Lösung von $\frac{\text{mol}}{10}$ $NaHCO_3$, $\frac{\text{mol}}{15}$ Na_2HPO_4 und $\frac{\text{mol}}{15}$ KH_2PO_4 (Mengenverhältnisse 10:6:4) colorimetrisch mißt und einmal die verwendeten 5 ccm der Lösung aus der Pipette vorsichtig auf den Boden des Reagensglases ausfließen, das andere Mal sie in das Glas einträufeln läßt, so bekommt man im ersten Fall die Wasserstoffionenkonzentration $10^{-6,61}$, im zweiten $10^{-6,77}$, d. h. ein sehr merkbares Alkalischwerden der Lösung durch Entweichen von Kohlensäure.

Auf diese Fehlerquelle, die sich natürlich besonders in der Nähe des Neutralpunktes geltend macht, ist man bei Reaktionsmessungen an Blut, wo man auf die elektrometrische Methode angewiesen ist, seit langem aufmerksam geworden und hat die Methode mit Rücksicht darauf verschiedentlich modifiziert, so daß kein — oder fast kein — Verlust an Kohlensäure während der Messung stattfindet. Auf diese Modifikationen kann hier nicht näher eingegangen werden, um so mehr, als sie neuerdings in

dieser Zeitschrift von Michaelis und Rona[1]) besprochen worden sind.

Ihnen allen haftet nämlich ein bestimmter Übelstand an: die Einstellung des Gleichgewichtes beansprucht viel zu lange Zeit, als daß man die Methode beim Studium experimentell variierter Reaktionsänderungen des Blutes anwenden könnte.

Nun haben allerdings Michaelis und Rona[2]) eine Modifikation vorgeschlagen, in der das Neue nicht die ruhende Wasserstoffatmosphäre über dem Blut ist — wodurch eine bedeutendere Entweichung der Kohlensäure vermieden wird —, sondern wo das Neue das geringe Eintauchen der Wasserstoffelektrode ins Blut ist, indem die Verbindung zwischen Blut und Elektrode nur durch Schaumblasen vermittelt wird.

Durch diesen einfachen Kunstgriff soll die richtige Einstellung in wenigen Minuten geschehen, und die Methode also für die uns interessierenden Zwecke verwendbar sein.

Indessen ist es M. und R. nicht gelungen, mit ihrer Methode Unterschiede der Reaktion des venösen und arteriellen Blutes nachzuweisen, so daß schon deshalb die Methode aufzugeben ist. Denn Höbers[3]) Versuche haben doch einen solchen Unterschied mindestens wahrscheinlich gemacht.

Was M. und R.s Prinzip des geringen Eintauchens anbelangt, so finden sich unten einige diesbezügliche Beobachtungen. Das Prinzip der ruhenden Wasserstoffatmosphäre, das die Methode mit den älteren Modifikationen gemeinsam hat, und wodurch der Verlust an Kohlensäure auf ein Minimum beschränkt werden soll, scheint mir nicht befriedigend; etwas Kohlensäure muß doch jedenfalls in den Wasserstoff hineindiffundieren. Dabei werden aber — wie Michaelis und Rona[4]) auseinandersetzen — zwei Fehlerquellen geschaffen. Erstens wird der Partialdruck des Wasserstoffes erniedrigt; der hierdurch entstandene Fehler muß jedoch, z. B. beim Blut, minimal sein, und wird (s. u.) nur ausnahmsweise einen ganzen Millivolt betragen können. Zweitens wird aber die Flüssigkeit durch Verlust an Kohlensäure alkalischer

[1]) Diese Zeitschr. 18, 317, 1909.
[2]) l. c.
[3]) l. c.
[4]) l. c., S. 330.

werden, um wieviel, ist vorläufig ganz unbekannt. Daß diese letzterwähnte Fehlerquelle eine wirklich bedeutsame ist, wird unten — Abschnitt D — nachgewiesen werden.

So war es also mein Bestreben, eine Form der elektrometrischen Reaktionsbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten, speziell des Blutes, zu finden, die weitgehende Genauigkeit mit großer Schnelligkeit verbindet.

Keine der bestehenden Methoden genügt, dem obenstehenden zufolge, diesen Anforderungen. Und wie wichtig die Lösung des Problems ist, leuchtet wohl ein. Nicht nur, wo die elektrometrische Messung allein anwendbar ist, wie beim Blut, sondern auch als Kontrollmethode bei Benutzung der colorimetrischen Messung überall da, wo kohlensäurehaltige Flüssigkeiten zur Untersuchung gelangen, wäre eine solche Methode wünschenswert.

Bei der Lösung der gestellten Aufgabe ist es mir eine unentbehrliche Hilfe gewesen, die zahlreichen einschlägigen Erfahrungen des Herrn Prof. S. P. L. Sörensen, in dessen Laboratorium diese Untersuchungen ausgeführt worden sind, ausnutzen zu können. Ich fand im Carlsberg-Laboratorium nicht nur freundliche Unterstützung und wertvolle Ratschläge, sondern auch eine vollkommene Einrichtung sowohl für Elektrometrie als für Colorimetrie, und, was ich besonders hervorheben möchte, die bekannten Sörensenschen Standardflüssigkeiten, die es ermöglichten, bequem Lösungen von irgendeiner genau bekannten Wasserstoffionenkonzentration herzustellen, und so bei Ausbildung der Methode immer unter Kontrolle zu arbeiten. Für diese mir geleistete Unterstützung spreche ich dem Herrn Prof. Sörensen meinen herzlichsten Dank aus, ebenso den Herren cand. Jürgensen und cand. Palitzsch.

Bei meinen Untersuchungen habe ich — nach vergeblichen Bemühungen, irgend eine brauchbare Sauerstoffelektrode aufzufinden — die gewöhnlich im Carlsberg-Laboratorium benutzte elektrometrische Versuchsaufstellung[1]) gebraucht: ein Element, bestehend aus einer Quecksilber-Kalomel-Elektrode in einer $^{n}/_{10}$-Kaliumchloridlösung und einer Platin-Wasserstoff-

[1]) Siehe: S. P. L. Sörensen, l. c., S. 150.

Elektrode in der zu untersuchenden Lösung; zwischen den beiden Elektrodenflüssigkeiten befand sich eine 3,5 n-Kaliumchloridlösung,[1]) wobei das Diffusionspotential — jedenfalls nahe am Neutralpunkt, wo meine Messungen vorgenommen worden sind — vernachlässigt werden kann. Betreffs Einzelheiten der Versuchsmethodik muß ich im übrigen auf die zitierte Abhandlung Sörensens verweisen.

Da ich von Anfang an die Absicht hatte, die Reaktion des stetig — auch während der Messung — strömenden Blutes mittels der eingetauchten Elektrode zu bestimmen, mußte ich mir ein besonderes Elektrodengefäß machen lassen, das ein solches Verfahren gestattete.

Dieses Gefäß, das sich auch bei der schießlich erreichten Methodik bewährte, wird unten des näheren beschrieben (siehe Fig. 2).

Ich untersuchte nun zuerst, ob es möglich sei, mit der Platinschwarzelektrode in strömender Wasserstoffatmosphäre und mit luftgesättigter, strömender Elektrodenflüssigkeit (Phosphatmischungen nach Sörensen) korrekte oder doch konstante Messungen zu erzielen. Es zeigte sich bald, daß mit dieser Versuchsanordnung jedenfalls zu niedrige Potentiale — zu große Wasserstoffionenkonzentrationen — gemessen wurden, jedoch konstante in demselben Grade, wie alle Verhältnisse (Geschwindigkeiten der Strömung des Wasserstoffes und der Flüssigkeit, Eintauchen der Elektrode) konstant gehalten wurden. Nun wird ein solches Konstanterhalten der Versuchsbedingungen im lebenden Organismus natürlich eine Unmöglichkeit werden, z. B. würde der Grad des Eintauchens der Elektrode mit jedem Pulsschlage variieren, und schon deshalb wurde die Methodik aufgegeben. Dabei bemerkte ich aber — mit Michaelis und Rona in Übereinstimmung — daß das gemessene Potential um so höher — und richtiger — war, je weniger tief in die zu untersuchende Flüssigkeit die Elektrode hineinreicht, so daß wenn die Berührung nur eben stattfand, die Resultate nur 10 bis 15 Millivolt zu niedrig waren.

Versuche, die strömende Elektrodenflüssigkeit statt mit atm. Luft mit einer Wasserstoff-Sauerstoffmischung zu sättigen,

[1]) Siehe: N. Bjerrum, Zeitschr. f. physikal. Chem. 53, 428, 1905.

zeigten mir, was man sich vielleicht im voraus hätte sagen können, daß, sobald nur der geringste Unterschied zwischen dem Wasserstoffpartialdruck der Elektrodenflüssigkeit und der die Elektrode umgebenden Luft sich vorfand, immer zu niedrige Potentiale gefunden wurden, und zwar um so niedriger, je tiefer die Elektrode in die Flüssigkeit hineintauchte.

Diese Beobachtungen schienen anzudeuten, daß die Methode der ruhenden Wasserstoffatmosphäre über ruhender Versuchsflüssigkeit, die z. B. an Blut zur Verwendung kommt, erst dann konstante Messungen ergibt, wenn der Diffusionsaustausch von Gasen zwischen Wasserstoff und Flüssigkeit beendigt ist, d. h. gewöhnlich nach 6 bis 18 Stunden. Außerdem schien es kaum möglich, daß Michaelis und Ronas Methode des geringen Eintauchens — so wertvoll für die schnelle Erreichung eines annähernd richtigen Resultates sie auch ist — an und für sich schneller das schließliche Gleichgewicht erreichen läßt wie die älteren Methoden mit tiefer eingetauchter Elektrode.

Diesbezügliche Versuche, die ich mit luftgesättiger Phosphatmischung und ruhendem Wasserstoff anstellte, haben mir in der Tat gezeigt, daß je nach dem Grad des Eintauchens ein scheinbares Gleichgewicht des Potentiales schneller oder langsamer (nach 30 bis 120 Min.) erfolgt, daß aber dieses Gleichgewicht eben nur ein scheinbares ist: wenn man mindestens 6 Stunden abwartet, oder wenn man Wasserstoff durch die Flüssigkeit leitet, bekommt man — mit der gewöhnlichen Genauigkeit von $\pm$ 0,5 Millivolt — das korrekte Resultat.

Nebenstehend findet man (Fig. 1) in graphischer Wiedergabe ein solches Versuchsergebnis (ruhender Wasserstoff über mit kohlensäurefreier atm. Luft gesättigter Phosphatmischung), wo zuerst ein „Gleichgewicht" bei knapper Berührung der Elektrode mit der Lösung erreicht worden ist, dann, wo die Elektrode tiefer in die Lösung eingetaucht wurde, wieder ein (niedrigeres) Gleichgewicht erreicht worden ist; dann Wiederholung der ersten Versuchsphase mit ziemlich demselben Resultat, und schließlich Wasserstoffdurchleitung und schnelle Herstellung des wahren Gleichgewichtes.

Hiernach wage ich zu behaupten, daß ähnliche Fehler an dem von Michaelis und Rona benutzten Verfahren des geringen Eintauchens haften müssen, wenn auch nicht so große; der Kontakt ist ja bei M. und R. nur durch Schaum-

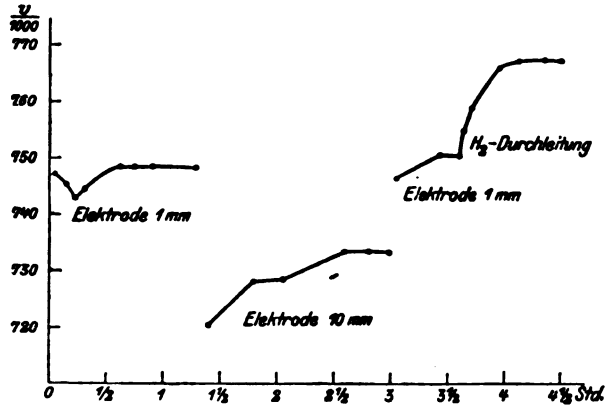


Fig. 1.

blasen vermittelt. Übrigens brauche ich, um diese Fehler zu demonstrieren, gar keine eigene Versuchsergebnisse anzuführen, sondern kann nur auf das von M. und R. selbst gegebene Beispiel[1]) von einer Messung der Alkalinität eines Serums verweisen:

Zusammenstellung der Kette, beendet um 11^{05} vorm.

Zeit	EMK in Volt	
11^{07}	0,3447	
11^{17}	0,3405	
11^{30}	0,3372	
11^{55}	0,3383	
12^{10}	0,3376	
1^{30}	0,3338	als konstant betrachteter endgültiger Wert
1^{45}	0,3338	
2^{00}	0,3335	
Nächster Tag vorm. 10^{00}	0,3401[2])	

Also: nach $2^1/_2$ Stunden ist ein „Gleichgewicht" gefunden worden, das ca. 6,5 Millivolt niedriger ist wie das am nächsten Tag gefundene.

[1]) l. c., S. 327.

[2]) Von mir hervorgehoben.

Unbefangen betrachtet ist doch wohl also das schließliche Gleichgewicht nach $2^1/_2$ Stunden noch nicht erreicht; es erscheint eben ziemlich willkürlich, diesen Wert als „konstant und endgültig" zu betrachten. Viel eher wird das am nächsten Tag gewonnene Potential das schließliche Gleichgewicht darstellen, das — was ich unter Abschnitt D zeigen werde — zu alkalisch ausfallen muß, weil es sich hier um eine kohlensäurehaltige Flüssigkeit handelt. Nach dem, was ich gesehen habe, zweifle ich nicht daran, daß die Werte der elekromotorischen Kraft, die von 1^{30} bis 2^{00} stammen, und die unbestreitbar eine mindestens 30 Minuten dauernde Konstanz vorspiegeln, nur darum konstant sind, weil zu dieser Zeit die oberflächlichen Serumschichten, in denen die Elektrode hineintaucht, mit der obenstehenden Wasserstoff-Kohlensäureatmosphäre in relativem Diffusionsgleichgewicht stehen. Am nächsten Tag, wenn der Diffusionsaustausch der gesamten Serummenge beendigt ist, bekommt man die wirkliche Konstanz, die eine merkbar mehr alkalische Reaktion des Serums infolge von Kohlensäureabgabe ergibt. Wenn man so von der Methode M. und R.s, an kohlensäurehaltigen Flüssigkeiten angewendet, die äußerste Genauigkeit verlangt, nimmt sie eine ebenso lange Zeit in Anspruch wie die älteren Methoden und gibt zu alkalische Werte.

Wenn ich also diesen Beobachtungen und Erwägungen zufolge M. und R.s Verfahren als für meine Zwecke unanwendbar aufgeben mußte, bin ich mir, wie schon gesagt, ganz klar darüber, daß damit eine Schnellmethode gegeben ist, deren Genauigkeit zu anderen Zwecken vielleicht ausreichen wird.

Das Verfahren, das ich schließlich ausbildete, ergibt sich logischerweise aus dem obenstehenden.

Zuerst muß der Diffusionsaustausch von Gasen zwischen der Elektrodenflüssigkeit und der obenstehenden Wasserstoffatmosphäre beschleunigt werden; die sehr einfache Art, wie dies geschieht, wird unter Abschnitt A besprochen. Handelt es sich nun um kohlensäurefreie Lösungen — Abschnitt B bis C —, wird schon jetzt die Messung richtige Resultate liefern. Hat man dagegen eine kohlensäurehaltige Flüssigkeit zu messen, so muß erst — sub D — untersucht werden, ob eine solche Flüssigkeit durch Kohlensäureverlust während des Diffusionsaustausches alkalischer wird oder nicht. Da diese Frage

bejahend beantwortet werden muß, wird sub E die bei der Messung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten notwendige Änderung der Methodik angegeben. Endlich werden unter F eine Anzahl Messungen an Blut mit ursprünglicher (Abschnitt A) und mit nach E abgeänderter Methodik angeführt.

A. Anstatt, wie bisher üblich, ruhig abzuwarten, bis die Diffusion zwischen Wasserstoff und Flüssigkeit beendigt ist — 4 bis 8 Stunden bei meinen Versuchen —, beschleunige ich den Diffusionsaustausch durch stetiges Wechseln der Oberfläche, d. h. durch Schütteln oder, richtiger gesagt, leises Schaukeln des Elektrodengefäßes, das auf dem Stativ befestigt ganz einfach aus dem Stromkreise entfernt wird und mit der Hand ca. 200mal von der senkrechten Lage in die wagerechte gedreht wird und wieder zurück; die 200 Drehungen sind gewöhnlich in 2 Minuten beendigt.

Hat man einfache Lösungen zu messen, seien sie frisch mit atm. Luft, Sauerstoff oder Kohlensäure gesättigt, so wird man schon nach diesen 200 Drehungen das bleibende Potential messen können, das sich nach fortgesetzten Drehungen immer wieder feststellen läßt. Mit Blut dauert es länger, bis das Gleichgewicht eintritt, gewöhnlich genügen jedoch 600 Drehungen, um ganz konstante Resultate zu erzielen.

Das benutzte Elektrodengefäß findet sich auf S. 326 in schematischer Darstellung abgebildet (Fig. 2). Die Einrichtung wird wohl ohne besondere Erklärung verständlich sein. Die Kapazität ist ca. 15 ccm, wovon die zu messende Flüssigkeit die ca. 7 einnehmen. Die Schliffe werden mit Vaseline geschmiert und mit federnden Klammern zusammengespannt. Vor der ersten Messung wird ca. $^1/_2$ Stunde lang Wasserstoff durch das leere Elektrodengefäß geleitet und so die Elektrode mit Wasserstoff gesättigt. Durch den Trichter, den zu vertreten beim Tierexperiment die Arterie oder Vene des Versuchstieres bestimmt ist, wird die zu messende Flüssigkeit in das mit reinem Wasserstoff gefüllte Elektrodengefäß getan, so daß ein Teil des Wasserstoffes durch die Flüssigkeit verdrängt wird, und die Elektrode den Flüssigkeitsspiegel eben berührt, oder doch nur wenige Millimeter eingetaucht ist.[1]) Gleichzeitig

[1]) Um eventuelle Fehler durch mangelhaften Diffusionsaustausch möglichst zu verkleinern (s. o.).

wird der Heber mit Flüssigkeit gefüllt und sein Hahn umgedreht.

Mit geschlossenen Hähnen werden jetzt die 200 Drehungen des Elektrodengefäßes vorgenommen, schließlich das Potential ermittelt und nach weiteren 200 Drehungen verifiziert. Die Ablesung des Potentials darf erst geschehen, nachdem die Flüssigkeit von den Seiten des Gefäßes gut heruntergeflossen ist, was bei Blut ungefähr 1 Minute dauert.

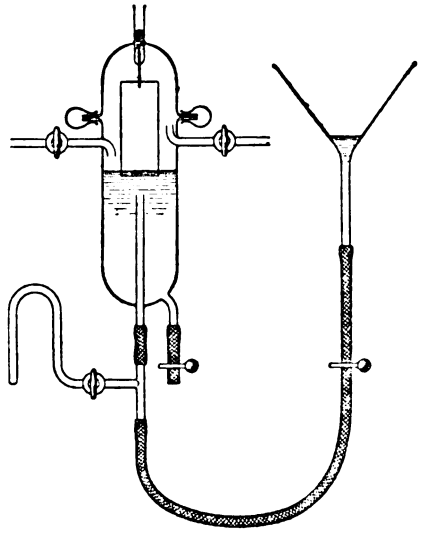


Fig. 2.

Soll zwecks einer neuen Messung die Lösung gewechselt werden, so geschieht dies am besten durch Verdrängung der alten Lösung mittels Wasserstoffes, worauf 2 Portionen der neuen Lösung nacheinander zur Abspülung des Gefäßes und der Elektrode verwendet und, immer unter Wasserstoffdruck, entfernt werden; das alles geschieht, um Zeit zu ersparen, damit die Elektrode ihre Sättigung mit Wasserstoff nicht verliert.

Wie aus der Figur ersichtlich, kann man, wo es sich um nicht kohlensäurehaltige Lösungen handelt, seine Resultate dadurch kontrollieren, daß man Wasserstoff von unten durch die Lösung emporsteigen läßt.

Diese Methodik habe ich nun in verschiedener Weise geprüft.

B. In der Tabelle I findet man Messungen luftgesättigter[1]) Phosphatmischungen, deren Potentiale schon im voraus bekannt waren. Die Übereinstimmung mit den von Sörensen und seinen Mitarbeitern gemessenen Potentialen ist vollauf befriedigend, indem in keinem Fall die Abweichung 1 Millivolt beträgt.

[1]) Mit kohlensäurefreier Luft gesättigt.

Tabelle I.

Luftgesättigte Phosphatmischung.

Lösung	Nach Minuten	Nach Drehungen	EMK Schaukelmethode	EMK Wasserstoffdurchleitung
1,0 sek. Phosph.[1])	7	150	0,6776	0,678
2,0 „ „	7	150	0,6968	0,697
3,0 „ „	2	100	0,7092	0,710
4,0 „ „	6	150	0,7203	0,721
5,0 „ „	2	100	0,7295	0,730
6,0 „ „	2	100	0,7400	0,740
7,0 „ „	6	150	0,7504	0,751
8,0 „ „	3	100	0,7620	0,7625
9,0 „ „	5	100	0,7824	0,783

In der Tabelle I findet man angegeben, wie lange Zeit und wie viele Drehungen die Herstellung des Diffusionsgleichgewichtes — und der Konstanz der elektromotorischen Kraft — beansprucht hat. Natürlich dauert die ganze Messung, mit Sättigung der Elektrode, Abspülung des Gefäßes, Verifizierung der Messung usw., länger wie 2 bis 7 Minuten; jede Messung erfordert durchschnittlich 25 Minuten, jedenfalls aber nicht längere Zeit, als bei Tierversuchen angängig.

C. Des weiteren untersuchte ich, ob die Methode auch mit sauerstoffgesättigten Lösungen ein korrektes Resultat ergab.

Versuch. 8,4 sek. Phosphat mit Sauerstoff gesättigt.

EMK Schaukelmethode	EMK Wasserstoffdurchleitung
0,7705	0,7705

Das Gleichgewicht wurde mit ca. 200 Drehungen in 15 Minuten erreicht.

Irgendeine depolarisierende Wirkung des Sauerstoffs auf die Elektrode habe ich bei derartigen kurzdauernden Versuchen niemals beobachtet. Bei der „Schaukelmethode" scheint der in der Flüssigkeit gelöste Sauerstoff nur als Verdünnungsmittel des Wasserstoffs Bedeutung zu haben, und diese Bedeutung ist ja, wie schon hervorgehoben, unmerkbar klein.

D. Schließlich wurde die „Schaukelmethode" an kohlensäurehaltigen Lösungen geprüft, die ja ihr eigentliches Feld

[1]) Bedeutet: 1 ccm $\frac{\text{mol}}{15}$ $Na_2HPO_4 + 9$ ccm $\frac{\text{mol}}{15}$ KH_2PO_4; „2,0 sek. Phosph." bedeutet: 2 ccm sek. + 8 ccm prim. Phosph., usw. (Sörensen, l. c., S. 202.)

darstellen. Wie Sörensen[1]) bemerkt hat, lassen sich Flüssigkeiten, die Kohlensäure oder Carbonate enthalten, mit den bisher üblichen Methoden elektrometrisch nicht genau messen, weil die Wasserstoffdurchleitung eine Kohlensäureaustreibung mit sich führt und so die Flüssigkeit alkalischer macht. Nur colorimetrisch, und dann natürlich mit großer Vorsicht, um Kohlensäureverlust zu vermeiden, gelingt es, die Ionenkonzentration solcher Flüssigkeiten annähernd zu bestimmen.

Es entsteht nun die Frage, ob die „Schaukelmethode" irgendeinen nennenswerten Verlust an Kohlensäure mit sich führt und so zu alkalische Messungen liefert. Diese Frage wird durch die Tabelle II beantwortet.

Aus der Tabelle II geht sehr deutlich hervor, daß eine Natriumbicarbonatlösung durch Verlust an Kohlensäure während der Elektrometrie bedeutend alkalischer wird; der Wasserstoffionenexponent steigt von 8,32 bis 8,47, die Wasserstoffionenkonzentration sinkt also von $10^{-8,32}$ bis $10^{-8,47}$, oder mit der anderswo üblichen Ausdrucksweise, von $0{,}48 \cdot 10^{-8}$ bis $0{,}34 \cdot 10^{-8}$.

Tabelle II.

$\frac{\text{mol}}{10}$ $NaHCO_3$.

	Wassersoffionenexponent, p_H [2])		
	Schaukelmethode	Colorimetrisch vor Elektrometrie	Colorimetrisch nach Elektrometrie
Lösung ohne Vorbereitung .	8,47	8,32	8,47
Dieselbe	8,45	8,30	8,49
Lösung 45′ gelüftet	8,64	8,60	8,68
„ 90′ „	8,78	8,72	8,74
„ 120′ „	9,14	9,20	9,17
„ — „	8,95	8,91	8,91
$\frac{\text{mol}}{10}$ $NaHCO_3$ mit 6,0 sek. Phosphat, gleiche Teile, mit CO_2 gesättigt	6,85	6,57	6,93

Ebenso steigt auch der p_H der mit Kohlensäure gesättigten Bicarbonat-Phosphatmischung infolge der elektrometrischen Mes-

[1]) l. c., S. 190.

[2]) Statt von der Ionenkonzentration 10^{-p} zu sprechen, wird hier nach Sörensens Vorschlag der Ionenexponent p angegeben.

sung bedeutend an, von 6,57 bis 6,85, oder die Wasserstoffionenkonzentration fällt von $0{,}27 \cdot 10^{-6}$ bis $0{,}14 \cdot 10^{-6}$. Dagegen sieht man, daß die gelüfteten Bicarbonatlösungen, die also Mischungen von Carbonat und Bicarbonat darstellen, keinen merkbaren Verlust an Wasserstoffionen durch die Elektrometrie erlitten haben.

Nach beendigter Elektrometrie wurde die benutzte Lösung sofort colorimetrisch bestimmt. Die Übereinstimmung zwischen den mit den beiden Methoden ermittelten Messungen ist befriedigend.

E. Da es sich also gezeigt hatte, daß der Diffusionsaustausch zwischen der kohlensäurehaltigen Flüssigkeit und dem Wasserstoff eine Verschiebung der Reaktion in alkalischer Richtung mit sich bringt, lag der folgende Versuch, den dadurch entstandenen Fehler zu eliminieren, ganz nahe. Nachdem erst die Flüssigkeit mit der Wasserstoffatmosphäre in Diffusionsgleichgewicht gebracht war, wozu gewöhnlich 200 Drehungen ausreichten, wurde unter Erhaltung der Wasserstoff-Kohlensäure-Atmosphäre über der Flüssigkeit die letztere gewechselt, was mit dem gegebenen Apparat (Fig. 2) sehr leicht ist. Man braucht nur den Trichter 2 bis 3 mal nacheinander mit ca. 7 ccm der Lösung zu füllen und die 2 Klemmhähne zu öffnen.[1]) Jetzt wird sich die Lösung in ungefährem Kohlensäuregleichgewicht mit der obenstehenden Atmosphäre befinden, und das Wasserstoffgleichgewicht wird sich ebenso schnell wie sonst — jetzt aber ohne Kohlensäureverlust — durch Schaukeln herstellen lassen.

Dabei wird allerdings der Partialdruck des Wasserstoffs niedriger als vorher werden, da aber das gemessene Potential sich erst mit dem Logarithmus des Wasserstoffdruckes ändert, bleibt dieser Umstand ohne bemerkbaren Einfluß.

In 3 Versuchen habe ich den prozentischen Gehalt an Wasserstoff bestimmt, der aus dem Diffusionsaustausch zwischen Blut und Wasserstoff bei 39° C in meinem Elektrodengefäß resultiert, und die folgenden Zahlen gefunden: 94,1; 94,0 und 95,6% H_2. Die Berechnung lehrt, daß dabei ein positiver Fehler von 0,8; 0,8 und 0,7 Millivolt verursacht wird der in den meisten Fällen ganz ohne Bedeutung ist, und der nötigenfalls korrigiert werden kann.

[1]) Natürlich wird man auch, um den Kohlensäureverlust von der Oberfläche aus besser zu vermeiden, statt eines Trichters eine Spritze zur Füllung des Gefäßes mit Lösung verwenden können.

Die Tab. III veranschaulicht die auf diese Weise gewonnene Übereinstimmung zwischen der elektrometrischen und der colorimetrischen Bestimmung des Wasserstoffionenexponenten bicarbonat- und kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten.

Tabelle III.

	p_H Schaukelmethode, Lösung 3 mal gewechselt	p_H Colorimetrisch
$\frac{mol}{10}$ $NaHCO_3$	8,30	8,34
$\frac{mol}{10}$ $NaHCO_3$ + 6,0 sek. Phosph., gleiche Teile, mit CO_2 gesättigt	6,58	6,61
Dieselbe	6,63	6,60

So wird es also jetzt möglich sein, die Wasserstoffionenkonzentration bicarbonat- und kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten schnell und richtig elektrometrisch zu bestimmen.

F. An Blut bei Zimmertemperatur habe ich die folgenden Bestimmungen ausgeführt, die anzudeuten scheinen, daß die bisher mit der Methode der ruhenden Wasserstoffatmosphäre gemachten Messungen etwas zu alkalisch ausgefallen sind und sein müssen in Übereinstimmung mit den obenstehenden Untersuchungen.

Das Blut war durch Schütteln mit Glasperlen defibriniertes Ochsenblut, wobei der Verlust an Kohlensäure dadurch beschränkt wurde, daß die Flasche nahezu voll von Blut war; die benutzte Blutportion wurde immer direkt aus der die Gerinnsel enthaltenden Flasche herauspipettiert.

Demnach ist die Wasserstoffionenkonzentration des auf die beschriebene Weise behandelten Blutes bei Zimmertemperatur (18 bis 20° C) mit der „Schaukelmethode" ohne Wechseln gemessen $10^{-7,47} = 0{,}34 \cdot 10^{-7}$, mit derselben Methode mit Wechseln deutlich, um ca. 30 %, größer, nämlich $10^{-7,37} = 0{,}43 \cdot 10^{-7}$. Daß die letztere Zahl die richtigere ist, kann nach dem obenstehenden nicht bezweifelt werden. Doch können die angeführten Messungen auf das zirkulierende Blut natürlich nicht direkt angewandt werden. — Ob das Blut 1, 2, 3

oder 4 mal gewechselt[1]) worden ist, scheint ohne erkennbaren Einfluß auf die Erhöhung der gemessenen Wasserstoffionenkonzentration gewesen zu sein.

Tabelle IV.

Defibriniertes Ochsenblut.

	p_H Schaukelmethode		Blut n-mal gewechselt[1])
	ohne Wechseln	mit Wechseln[1])	
Blut vom 8. X. 1910	7,45	—	—
Blut vom 10. X. 1910 . . .	7,47	—	—
Dasselbe	7,46	—	—
Dasselbe	7,43	—	—
Dasselbe am 12. X. 1910 . .	7,46[2])	—	—
Blut vom 24. X. 1910 . . .	7,46	7,37	3
Dasselbe	7,45	7,36	3
Blut vom 26. X. 1910 . . .	7,52	7,37	1
Dasselbe	7,47	7,40	3
Dasselbe	7,53	7,43	2
Dasselbe am 28. X. 1910 . .	7,50	7,35	4
Dasselbe	7,47	7,33	2
Durchschnitt	7,47	7,37	

Die jetzt bevorstehenden Messungen bei Körpertemperatur des dem Versuchstier frisch entnommenen Blutes unter variierten Versuchsbedingungen sind schon in Arbeit genommen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode angegeben, die Wasserstoffionenkonzentration Luft, Sauerstoff oder Kohlensäure enthaltender Flüssigkeiten direkt, schnell und richtig elektrometrisch zu bestimmen. Die Methode ist auch bei Blut anwendbar; die Messungen scheinen anzudeuten, daß die meisten früheren Bestimmungen eine etwas zu niedrige Wasserstoffionenkonzentration angegeben haben.

[1]) D. h.: Blutportion nach Herstellung des Kohlensäuregleichgewichtes gewechselt (siehe Abschnitt E).

[2]) Mit kohlensäurefreier atmosphärischer Luft 2 Stunden gelüftet $p_H = 7{,}66$.

Nachtrag zu der Arbeit:

Über das Verhalten des Chlors im Serum.

Diese Zeitschr. 29, 501, 1910.

Von

P. Rona.

(Eingegangen am 13. Dezember 1910.)

Herr Geheimrat Zuntz macht mich freundlichst darauf aufmerksam, daß die „Kompensationsdialyse" nicht — wie wir meinten — von Michaelis und mir, sondern von ihm und A. Loewy[1]) zuerst angewendet worden ist. Wir freuen uns, diesen Irrtum richtigstellen zu können. — Von älteren Arbeiten, die sich mit diffusiblen und nicht diffusiblen Bestandteilen des Serums beschäftigt haben, wären nachträglich die von Gürber[2]) und von Hamburger[3]) zu erwähnen.

---

[1]) Pflügers Archiv 58, 511, 1894.

[2]) Sitzungsber. d. med.-phys. Ges. zu Würzburg, Febr. 1895 (zit. nach Hamburger).

[3]) Arch. f. Anat. u. Phys. 1898, 1.

Über die Vorstufen des normalen gelben Harnfarbstoffs in ihren Beziehungen zur Diazoreaktion und über eine colorimetrische Schätzung des Urochroms sowie des Urochromogens.

Von

Moriz Weisz.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. Otto v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1910.)

I. Einleitung.

Frühere Untersuchungen[1]) über das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion hatten mich veranlaßt, diesen Körper als Chromogen des normalen gelben Harnfarbstoffs anzusprechen.

Bei diesen Versuchen war der durch die Arbeiten mehrerer Autoren[2, 3]) wahrscheinlich gewordene Zusammenhang des Prinzips der Ehrlichschen Reaktion mit den Proteinsäuren noch nicht berücksichtigt worden.

Von Beziehungen dieses Prinzips zum Urochrom war ja weder bei Bondzynski und Panek, welche die Oxyproteinsäure, noch bei Bondzynski, Dombrowski und Panek, welche die Antoxyproteinsäure mit dieser Reaktion in Zusammenhang gebracht hatten, die Rede. Als Dombrowski[4]) aus der Gruppe der Proteinsäuren einen durch Kupferacetat fällbaren Farbstoff heraushob, den er als normalen gelben Harnfarbstoff, als Urochrom, ansprach, habe ich infolge der ver-

[1]) Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 31 u. Beitr. z. Klin. d. Tub. 8, 177, 1907.

[2]) Bondzynski und Panek, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2959, 1903.

[3]) Bondzynski, Dombrowski und Panek, Zeitschr. f. phys. Chem. 54, 83, 1905.

[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. 54, 188, 1907/08 und Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 145, 575, 1907.

wandtschaftlichen Beziehungen, die sich nunmehr zwischen dem Prinzip der Diazoreaktion und dem Urochrom (beide waren ja als Proteinsäuren anzusprechen) ergeben hatten, erwartet, für meine eigenen Beobachtungen in den Arbeiten dieser Autoren irgendwie eine Bestätigung zu finden. Aber weder haben die Darsteller der Antoxyproteinsäure dieser den Charakter eines Chromogens zugesprochen, noch hat Dombrowski einen Zusammenhang zwischen seinem Urochrom und der Diazoreaktion festgestellt.

Ich habe nunmehr die in Betracht kommenden Proteinsäuren auf ihre Beziehungen zur Ehrlichschen Diazoreaktion geprüft und untersucht, ob sich der Zusammenhang dieser Reaktion mit dem normalen gelben Harnfarbstoff bzw. mit seinem Chromogen noch auf Grund unserer gegenwärtigen Kenntnisse von den Proteinsäuren aufrecht erhalten lasse. Die Fraktionierung des Harnes nach den uns jetzt zu Gebote stehenden Methoden und colorimetrische Untersuchungen haben diesen Zusammenhang bestätigt. Die letzteren erlaubten eine Schätzung des normalen gelben Harnfarbstoffes und seiner Vorstufen vorzunehmen. In Übereinstimmung mit früheren fremden und eigenen Untersuchungen habe ich festgestellt, daß wir das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion nicht als normalen Harnbestandteil ansprechen können, demgemäß auch nicht als Antoxyproteinsäure, die ja nach den Angaben ihrer Entdecker in jedem Harne vorkommt, und daß der durch die Kupferacetatfällung von Dombrowski dargestellte und von ihm als Urochrom bezeichnete Farbstoff nicht der Träger der normalen gelben Harnfarbe sei, sondern sich an der letzteren meist nur in untergeordneter Weise beteiligt. Weiterhin konnte ich feststellen, daß das Prinzip der Diazoreaktion mit dem Urochrom Dombrowskis nichts zu tun hat, sondern zu dem nach Entfernung dieses Körpers noch zurückbleibenden normalen gelben Harnfarbstoff im Verhältnisse eines Chromogens stehe.

II. Die Beziehungen der Proteinsäuren zur Ehrlichschen Diazoreaktion.

Bondzynski, Dombrowski und Panek wiesen zwar darauf hin, daß Antoxyproteinsäure die Diazoreaktion nach Ehrlich gäbe, ließen es jedoch, ebenso wie auch später Ginsberg[1]),

[1]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 411, 1907.

noch dahingestellt, ob diese Substanz die Ursache der in pathologischen Harnen beobachteten Reaktion sei. Im Widerspruch zu der Auffassung dieses Prinzips als Antoxyproteinsäure stand die von verschiedenen Autoren behauptete Fällbarkeit desselben durch Bleiessig, dann der Umstand, daß zwar die Antoxyproteinsäure, nicht aber das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion ein normaler Harnbestandteil ist. Es lagen somit zwei Widersprüche mit den sonst bekannten Tatsachen vor, die einer Aufklärung bedurften.

Ich untersuchte daher nochmals das Verhalten von Harnen mit positiver Diazoreaktion zu Bleiessig, nachdem ich vorher mit Ätzbaryt gefällt und den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure entfernt hatte.

Es ergab sich, daß das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion ein in Bleiessig sehr gut lösliches Bleisalz bildet, das vorwiegend in das Filtrat der Bleiessigfällung übergeht. Die der Ehrlichschen nahestehende „negative" Diazoreaktion normaler Harne war hauptsächlich im Bleiessigniederschlag und den ihm entsprechenden Barytsalzen zu finden. Zwischen dem Prinzip der Ehrlichschen und dem Prinzip der jedem Harne zukommenden „negativen" Diazoreaktion besteht somit der Unterschied, daß das letztere vorwiegend im Bleiessigniederschlag, das erstere dagegen im Filtrate davon enthalten ist.

Wenn man einen positive Diazoreaktion gebenden Harn mit verdünnter Permanganatlösung ($1\,^0/_{00}$) so lange versetzt, bis die Reaktion negativ geworden ist, so tritt hierbei nach meinen früheren Untersuchungen ein gelber Farbstoff vom Charakter des Urochroms auf. Das durch Oxydation umgewandelte Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion verhält sich jetzt genau so wie das Prinzip der „negativen" Diazoreaktion normaler Harne; es ist überwiegend im Bleiessigniederschlag zu finden. Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses zu normalem Harne hinzugefügt, entfärbt diesen fast vollständig, dagegen einen Harn mit positiver Diazoreaktion nicht. Im letzteren Falle zeigt das Filtrat eine schwach gelblich-grüne Färbung, die von der Farbe des Chromogens der Diazoreaktion in alkalischer Lösung herrührt. Oxydiert man jedoch vorher in einem solchen Harne das Prinzip der Diazoreaktion, so gelingt es auch jetzt, wenn ein

Überschuß des Fällungsmittels vermieden wird, den Harn durch Bleiessig zu entfärben.

Das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion geht durch Oxydation in einen Farbstoff über, der sowohl seiner Farbe, wie seiner Diazoreaktion und seinem Verhalten zu Bleiessig nach dem normalen gelben Harnfarbstoffe entpricht. Die teilweise Löslichkeit des Bleiessigniederschlags in verdünnter Essigsäure erlaubt es, den normalen gelben Harnfarbstoff vom Pigmente Dombrowskis zu trennen, da das letztere ebenso wie mit Kupferacetat auch mit Bleiacetat auch bei saurer Reaktion ein unlösliches Salz bildet. Wenn wir daher der Urochromfraktion des Harnes näher kommen wollen, so werden wir aus einem Barytsirup zunächst den Bleiessigniederschlag herstellen („Alloxyproteinsäurefraktion"), der eine Trennung von der Oxy- und Antoxyproteinsäure erlaubt. Durch Behandlung des Bleiessigniederschlags mit verdünnter Essigsäure ist weiterhin eine Trennung vom Pigmente Dombrowskis möglich. Der in verdünnter Essigsäure lösliche Teil ist der Träger der normalen Harnfarbe.

In Harnen mit positiver Diazoreaktion wurde ferner die Kupferacetatfällung nach Dombrowski vorgenommen. Das Urochrom Dombrowskis zeigte zerlegt fahlgelbe Farbe und gab keinerlei Diazoreaktion, das Filtrat dagegen zeigte die Diazoreaktion des Ausgangsharnes bei einer deutlich diesem entsprechenden Eigenfarbe. Dasselbe Verhalten wurde bei den aus normalen Harnen gewonnenem Urochrom Dombrowskis konstatiert. Das aus pathologischem Harne gewonnene Urochrom Dombrowskis unterscheidet sich also nicht von dem aus normalen Harnen gewonnenen. Die Behandlung des Dombrowskischen Pigmentes mit Oxydationsmitteln hatte keinen Farbenumschlag im Sinne von Gelb, sondern höchstens eine leichte Bräunung zur Folge. Dasselbe Verhalten zeigten die entsprechenden Barytsalze.

Das Filtrat der Kupferacetatfällung aus Harnen mit positiver Diazoreaktion wurde bei schwach saurer Reaktion mit 20% Quecksilberacetatlösung unter Vermeidung eines Überschusses gefällt. Der Quecksilberacetatniederschlag enthält den Harnfarbstoff, das Filtrat davon ist fast farblos. Das farblose Filtrat und die ihm entsprechende Barytverbindung geben, wie

schon Bondzynski, Dombrowski und Panek festgestellt haben, keinerlei Diazoreaktion, dagegen war dieselbe im Quecksilberacetatniederschlage und dem entsprechenden Barytsalze vorhanden. Die letztere Fraktion zeigte durch ihre Farbe deutlich an, daß sie den normalen gelben Harnfarbstoff enthalte. Diese Fraktion wurde mit Bleiessig gefällt, hierauf wieder zerlegt. Im Bleiessigniederschlag wie im Filtrat war eine positive Diazoreaktion vorhanden, im letzteren jedoch weit stärker. Die Oxydation des zerlegten Filtrates mit Permanganat hatte dasselbe Ergebnis wie früher, nämlich das Auftreten eines gelben Farbstoffes, das Verschwinden der positiven, dafür aber das Auftreten der „negativen" Diazoreaktion der normalen Harne und Fällbarkeit des durch Oxydation gebildeten Farbstoffes durch Bleiessig.

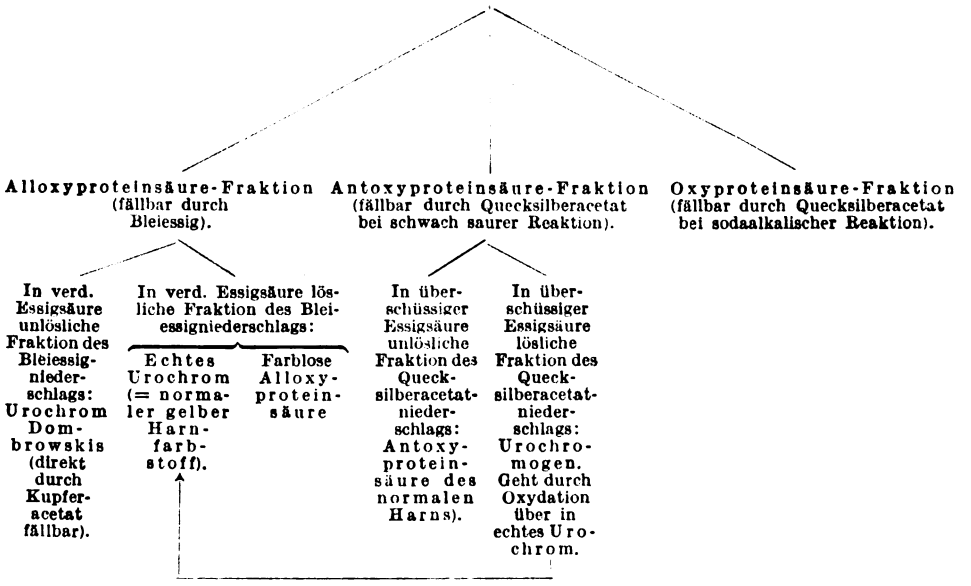
Die gleiche Fraktionierung wurde auch mit normalem Harne vorgenommen. Das Ergebnis war, was die Farbe der Fraktionen betrifft, das gleiche.

Es wurde nun der Versuch gemacht, auf Grund einer anderen, von Bondzynski, Dombrowski und Panek angegebenen Eigenschaft die All- von der Antoxyproteinsäurefraktion zu trennen, nämlich der Schwerlöslichkeit des antoxyproteinsauren Quecksilbers gegenüber den entsprechenden Salzen der Alloxyproteinsäure. Nach Fällung des Pigmentes von Dombrowski wurde der bei schwach saurer Reaktion gewonnene Quecksilberacetatniederschlag im Überschusse mit Essigsäure behandelt und der gelöste von dem ungelöst gebliebenen Anteil getrennt. Beide Fraktionen erwiesen sich als gefärbt, jedoch stand nur die in Essigsäure gelöste Fraktion ihrer Farbe nach dem ursprünglichen Harne nahe. Nur diese Fraktion und die entsprechenden Barytsalze gaben, aus positiven Harnen dargestellt, die Ehrlichsche Diazoreaktion.

Legt man daher die von Bondzynski, Dombrowski und Panek betonte Eigenschaft der Antoxyproteinsäure, ein auch in starker Essigsäure unlösliches Quecksilbersalz zu bilden, der Darstellung zugrunde, so kann man den auf diese Weise gewonnenen Körper nicht als Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion ansprechen, betrachtet man jedoch ihre zweite, von diesen Autoren als charakteristisch angeführte Eigenschaft, nicht durch Bleiessig gefällt zu werden, so ergibt sich allerdings, daß das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion reichlich im Filtrat des Bleiessigniederschlags resp. in der sogenannten Antoxyproteinsäurefraktion zu finden ist.

Wie früher ausgeführt wurde, bewirkt die Oxydation des Prinzips der Ehrlichschen Diazoreaktion das Auftreten eines durch Bleiessig fällbaren Farbstoffes.

Das Verhältnis des Urochroms Dombrowski, des normalen gelben Harnfarbstoffes (echtes Urochrom) und des Chromogens der Ehrlichschen Diazoreaktion (= Urochromogen) zueinander und zu den bisher beschriebenen Fraktionen der Proteinsäuren wird durch nachstehendes Schema veranschaulicht:



Es sei hier noch bemerkt, daß Bocchi und Ghelfi[1]) eine von ihnen aus pathologischen Harnen als Barytsalz gewonnene Substanz, die sie als Chromoxyproteinsäure bezeichnen, als Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion ansehen. Die Substanz, die N- und S-haltig war und infolgedessen als Proteinsäure bezeichnet wurde, enthielt offenbar das Urochromogen.

III. Der normale gelbe Harnfarbstoff und das Urochrom Dombrowskis.

Es war wünschenswert, den Urochromogencharakter des Prinzips der Diazoreaktion auch durch colorimetrische Unter-

[1]) Il Tommasi 1908, H. 5. Ref. Malys Jahresber. 38, 815, 1908.

suchungen der Anschauung näher zu rücken. Zunächst war jedoch genauer festzustellen, welchen Anteil das Pigment, das Dombrowski als Urochrom bezeichnet hat, an der Harnfarbe nimmt. Dombrowski hat durch Fällung mit Kupferacetat bei neutraler Reaktion einen Farbstoff gewonnen, den er als Träger der normalen gelben Harnfarbe anspricht. Das eigentümliche Verhalten von Harnen mit positiver Diazoreaktion zu Oxydationsmitteln, das hierbei beobachtete Auftreten eines ausgesprochen gelben Farbstoffes einerseits, das Fehlen jeder Beziehung des Dombrowskischen Pigmentes zur Ehrlichschen Diazoreaktion anderseits veranlaßten mich, die Behauptung Dombrowskis, daß der von ihm durch die Kupferacetatfällung gewonnene Farbstoff Urochrom sei, näher zu prüfen. Ich ging hierbei genau nach Dombrowskis Vorschrift vor und stellte direkt aus Harn wie auch aus der Barytfraktion desselben sein Urochrom dar. Daß meine Darstellung mit der von Dombrowski übereinstimmt und mir hierbei nicht etwa ein großer Teil des Farbstoffes entging, ergibt sich aus meinen in einer früheren Arbeit[1]) mitgeteilten quantitativen Bestimmungen dieses Körpers, die für die Norm Werte ergaben, die denen Dombrowskis nahestehen. Schon damals war mir bei der Betrachtung solcher Kupferacetatfällungen nach ihrer Zerlegung, ihre (der Eigenfarbe des Harnes wenig entsprechende) Färbung aufgefallen. Diese Farbe war nicht das helle Gelb des normalen Harnes, das einen leicht grünlichen Stich hat, sondern es war ein fahles mattes Gelb, das selbst bei starker Konzentration nicht als harnfarben angesehen werden konnte. Ich dachte anfangs daran, daß durch die Zerlegung mit H_2S die ursprüngliche Farbe gelitten haben konnte, aber da bei wiederholten Darstellungen das Dombrowskische Pigment immer wieder dasselbe fahle Gelb zeigte, das Filtrat dagegen sich bei der Zerlegung trotz der gleichartigen Prozedur schön harngelb erwies, erschien es mir nicht weiter zweifelhaft, daß das von Dombrowski dargestellte Pigment mit dem normalen gelben Harnfarbstoffe nicht identisch sein konnte. Vergleichende colorimetrische Untersuchungen zwischen dem Pigmente Dombrowskis, dem Harne und dem Filtrate von der Kupferacetatfällung nach Dombrowski er-

[1]) Diese Zeitschr. 27, 175, 1910.

gaben, daß das Urochrom dieses Autors weder qualitativ noch quantitativ der Eigenfarbe des Harnes entsprach, daß vielmehr nach der Fällung des Dombrowskischen Pigmentes der größte Teil der Harnfarbe noch vorhanden war. Der colorimetrische Vergleich zwischen dem Urochrom Dombrowski, dem Harn und dem Filtrat war wegen der Verschiedenheit der Farben nicht möglich, dagegen war der Vergleich zwischem dem Filtrat nach der Fällung von Dombrowskis Pigment und dem Originalharne, besonders nach der Aussalzung desselben mit Ammonsulfat, wegen der großen Farbenähnlichkeit leicht ausführbar. Originalharn verhielt sich zum Filtrat von Urochrom Dombrowskis colorimetrisch bestimmt (Colorimeter von Dubosq in Paris):

im 1. Fall = 25:20,
„ 2. „ = 28:20,
„ 3. „ = 23:20.

Die Farben verhielten sich folgendermaßen: Der Originalharn war gelb mit leicht bräunlichem Stich, das Filtrat nach Fällung des Urochroms Dombrowskis war gelb mit grünlichem Stich. Das Urochrom Dombrowskis war fahl braungelb. Es wurden selbstverständlich bei den obigen colorimetrischen Bestimmungen alle Flüssigkeiten dem Ausgangsharne entsprechend konzentriert oder verdünnt und auf gleiche Reaktion gegen Lackmus gebracht, da die Harnfarbe sich anders bei saurer als bei alkalischer Reaktion verhält.

Die Abhängigkeit der Harnfarbe von der Reaktion konnte bei jedem normalen oder pathologischen Harne konstatiert werden, und zwar bei allen Fraktionen des Harnes, die den gelben Harnfarbstoff enthielten. Der saure Harn zeigte ein dunkleres Gelb, als der alkalisch gemachte. Letzterer zeigte den grünlich-gelben Stich, der dem Urochrom Garrods auch nach den Untersuchungen von Klemperer zukommt, sehr deutlich. Dieselbe Farbenverschiedenheit je nach der Reaktion kann man im entbleiten Filtrate der Bleiessigfällung aus Harnen mit pos. Diazoreaktion, also in der Antoxyproteinsäurefraktion, gleichfalls nachweisen, wenn man das hier enthaltene Prinzip der Diazoreaktion durch Zusatz von einigen Tropfen 1‰ige Permangatlösung oxydiert.

Dombrowski hat für sein Pigment keinerlei Einfluß der Reaktion konstatieren können. Vergleicht man colorimetrisch eine durch Lösung des Bleiessigniederschlags in verdünnter Essigsäure aus einem normalen Harne erhaltene Urochromlösung mit einer Antoxyproteinsäurefraktion aus einem Harne mit pos. Diazoreaktion, in der durch Zusatz von

Kaliumpermanganat das Chromogen dieser Reaktion in den entsprechenden Farbstoff umgewandelt worden ist, so zeigen beide Flüssigkeiten bei derselben Reaktion auch gleiche Farbe, nämlich Gelb mit leicht grünlichem Stich. Mit dieser charakteristischen Farbe hat das Pigment Dombrowskis nichts gemeinsam. Dagegen verleiht dieses manchen Harnen einen bräunlichen Stich. Fällt man solche Harne bei schwach essigsaurer Reaktion mit neutralem Bleiacetat, so geht der normale gelbe Harnfarbstoff durch das Filter, dagegen bleibt das Pigment Dombrowskis als Bleisalz auf dem Filter. Zerlegt man Niederschlag und Filtrat mit verdünnter Phosphorsäure, so erhält man aus dem Filtrat eine Urochromlösung, aus dem Niederschlag dagegen eine Lösung des Dombrowskischen Pigmentes. Beide unterscheiden sich in der angegebenen Weise durch ihre Farbe. Vereinigt man beide Lösungen, so erhält man die ursprüngliche Harnfarbe.

Nach den colorimetrischen Untersuchungen konnte dem Pigmente Dombrowskis nur ein geringer Einfluß auf die Harnfarbe zugeschrieben werden. Es erwies sich als ein bräunlich-gelber Farbstoff von geringer Färbekraft, der dem Harne einen leicht bräunlichen Stich zu verleihen imstande ist, mit der Grundfarbe des Harnes aber nichts zu tun hat. Denn diese stellt ein helles Gelb mit grünlichem Stiche dar. Es sei mir gestattet, mit Rücksicht auf die prinzipielle Wichtigkeit der Frage auf die Harnfarbe im folgenden näher einzugehen.

IV. Die Harnfarbe.

Wenn man eine größere Zahl von verschiedenen normalen und pathologischen Harnen nebeneinander stellt, ist man überrascht, wie verschiedenartig dieselben gefärbt sind.

Vogel[1]) unterscheidet beim Harne 9 Farben, die er wieder in 3 Gruppen teilt. In den älteren Auflagen des Lehrbuches der Harnanalyse von Neubauer und Vogel ist den Farbenverschiedenheiten des Harnes eine eingehende Besprechung gewidmet und findet sich eine Farbentabelle, die diese verschiedenen Farben wiedergibt. Vogel hat schon Schätzungen des Harnfarbstoffes vorgenommen, indem er die in 100 ccm eines Harnes, der den ersten Farbengrad „blaßgelb" besitzt, enthaltene Farbstoffmenge als Einheit setzte. Jede folgende Farbe der Skala ist nach Vogel 2mal so stark tingiert als die vorhergehende, enthält also 2, 4 usw. mal soviel Farbstoff als der blaßgelbe Harn. Der Bestimmung des Harnfarbstoffes, in dem Vogel ein Derivat der roten Blutkörperchen sieht, schreibt er große klinische Bedeutung zu. Der Versuch Vogels, die Harnfarbe am Krankenbette für Diagnose und

[1]) Neubauer und Vogel, Harnanalyse, 1856.

Prognose zu verwerten, ist als Bestreben aufzufassen, der damals noch vielfach geübten und von Charlatanen mißbrauchten Harnschau oder Uroskopie eine wissenschaftliche Grundlage zu geben. Die Bestrebungen Vogels haben kein praktisch brauchbares Resultat gezeitigt. In den späteren Auflagen des Lehrbuches von Neubauer und Vogel sind sowohl die Farbentabellen wie die Erörterungen über die Semiotik der Harnfarbe weggelassen.

Einige durch die Erfahrung sichergestellte Eigentümlichkeiten der Harnfarbe haben auch noch heute eine gewisse klinische Bedeutung. Man spricht auch jetzt noch von einem „hochgestellten" Harn, worunter man die Harne der 2. Gruppe von Vogels Skala versteht. Man ist gewöhnt, diese Harne als „Fieberharne" anzusehen. Ferner kennt der Kliniker eine sogenannte „Urina spastica", d. i. ein heller, farbstoffarmer Harn, wie er z. B. bei Anfällen von „Angina pectoris" ausgeschieden wird; eine „Urina potus", d. i. ein wässeriger Harn von geringem spez. Gewicht und eine „Urina chyli", d. i. ein nach reichlichen Mahlzeiten ausgeschiedener roter Harn. Diese Bezeichnungen aus der Zeit, da man die Harnschau höher einschätzte, als es heute der Fall ist, haben sich noch erhalten. Der Kliniker pflegt ferner bei der chronischen Nephritis aus der Harnfarbe Schlüsse zu ziehen. Spärlicher Harn mit geringem Farbstoffgehalt spricht ceteris paribus für eine schwerere Nierenstörung. Daß der Harn von Rekonvaleszenten nach fieberhaften Krankheiten, von Chlorotischen und Anämischen sehr farbstoffarm sein kann, ist gleichfalls eine Beobachtung, die man häufig am Krankenbette zu machen Gelegenheit hat.

Sonst hat sich von der Uroskopie nichts erhalten. Je mehr man gelernt hat, die unsicheren äußeren Eigentümlichkeiten des Harnes durch sichere chemische Reaktionen zu ersetzen, um so mehr mußte natürlich diese infolge der mangelhaften Kenntnisse über die Farbstoffe des Harns unkritische Art der Verwertung der Harnfarbe zurücktreten. Das Urochrom war zur Zeit, als Vogel seine Farbenskala aufstellte, noch nicht bekannt, ebensowenig das Urobilin und Urobilinogen. Dagegen kannte man bereits das Uroerythrin. Die Zusammenfassung dieser und anderer verschiedenartiger Farbstoffe unter einem Begriff mußte sich natürlich mit der Zeit als unbrauchbar erweisen. Dies erhellt z. B. einfach daraus, daß ein und derselbe Harn, je nachdem er im frischen Zustande oder nachdem sich das Urobilinogen schon in Urobilin verwandelt hat, einen ganz verschiedenen Farbstoffwert ergeben mußte. Auch nach der Entdeckung des Urochroms durch Thudichum und des Urobilins und Urobilinogens durch Jaffe haben wenige an eine Verwertung der Harnfarbe für klinische Zwecke gedacht. Meines

Wissens hat bloß Klemperer[1]) den Versuch einer Bestimmung des Urochroms gemacht, und zwar unter Zugrundelegung eines eigenen Verfahrens der Urochromdarstellung, das auf der Methode von Garrod basierte. Er fand im „Echtgelb" einen Farbstoff, der verdünnt die Farbe des von ihm dargestellten Urochroms zeigte. In planparallelen Gläsern wurden die Harne mit Echtgelblösungen, deren Farbe einer 0,1, 0,2%igen usw. Urochromlösung entsprach, verglichen. Danach berechnete Klemperer den Urochromgehalt des Harnes. Den Urobilingehalt glaubte Klemperer vernachlässigen zu können, weil derselbe ja als Urobilinogen ausgeschieden wird. Aber diese Vernachlässigung des Urobilins scheint mir bei Klemperers Methode einen wesentlichen Fehler zu bilden. Das Urobilinogen verwandelt sich ja sehr rasch in Urobilin und gibt dadurch natürlich Anlaß zu höheren Schätzungen des normalen gelben Harnfarbstoffes. Nur dadurch kann ich mir Klemperers Angaben über Schwankungen von 0,8 bis 2,7 g in der täglichen Urochromausscheidung bei normalen Individuen erklären.

Als Träger der normalen Harnfarbe sieht man heute allgemein das Urochrom Garrods an. „Das Urochrom ist der typische Farbstoff des normalen und des pathologischen Harnes. Es macht die Hauptmenge der Harnfarbstoffe aus und erteilt dem Harne die gelbe und orange bis braune Färbung." (Neubauer und Vogel, Lehrb. der Harnanalyse, 1908.)

Die Untersuchungen über die Proteinsäuren machen es wahrscheinlich, daß das Urochrom Garrods kein einheitlicher Körper sei.

Dombrowski meint, daß es mit All-, Ant- und Oxyproteinsäure verunreinigt sei. Die Verunreinigung mit Alloxyproteinsäure ist kaum wahrscheinlich, weil Garrod sein Urochrom durch Äther aus der alkoholischen Lösung gefällt hat, die Alloxyproteinsäure aber nach den Angaben von Bondzynski, Dombrowski und Panek durch Äther aus der alkoholischen Lösung nicht gefällt wird. Es bliebe noch die Möglichkeit der Verunreinigung des Urochroms Garrods mit Ant- und Oxyproteinsäure und mit dem Pigmente Dombrowskis übrig. Die Urochromlösungen, die ich aus dem Barytsirup normaler Harne durch Lösung des Bleiessigniederschlags in verdünnter Essigsäure erhalten habe, sind auf Grund ihrer Darstellung als frei von Oxy- und Antoxyproteinsäure

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1903, 313.

und vom Pigmente Dombrowskis anzusehen. Die in diesen Lösungen noch enthaltene Alloxyproteinsäure ist jedoch farblos. Die für die Farbe des Urochroms von mir auf Grund dieser Fraktion abgeleiteten Schlüsse werden daher durch die Anwesenheit von Alloxyproteinsäure in meinen Lösungen nicht weiter berührt. Da es sich mir zunächst um die Feststellung der Farbenverhältnisse der verschiedenen Proteinsäuren handelte, die Alloxyproteinsäure aber von ihren Darstellen als farblos bezeichnet wird, so kann ich mit dem Vorbehalte, daß eigentlich zur Gewinnung einer Urochromfraktion die Alloxyproteinsäure erst beseitigt werden müßte, die erwähnte Fraktion als Urochromfraktion ansprechen. Ob diese Fraktion vielleicht noch andere Substanzen enthält, müßten weitere genauere Untersuchungen ergeben. Anderweitige gefärbte Beimengungen in dieser Fraktion anzunehmen, ergab sich kein Anlaß.

Die Urochromfraktion zeigt zerlegt hellgelbe Farbe mit einem leicht grünlichen Stiche. Diese Farbe ist bei alkalischer Reaktion ausgesprochener als bei saurer. Dies wäre somit die Farbe des normalen gelben Harnfarbstoffes oder des Urochroms schlechtweg. Wir finden diese Farbe häufig bei normalen Harnen, namentlich Vormittagsharnen. Dieselbe Farbe erhält man, wenn man das von Urochrom freie Filtrat der Bleiessigfällung eines Harnes mit positiver Diazoreaktion mit einigen Tropfen einer $1\,^0/_{00}$igen Permanganatlösung (Überschuß zu vermeiden wegen leicht eintretender Braunfärbung) oder mit einer konz. Kaliumpersulfatlösung versetzt, einige Tropfen Essigsäure zur Lösung des Niederschlags hinzufügt und vom ev. ungelöst Gebliebenen filtriert. Sowohl die Urochromlösung des normalen Harnes wie die aus dem Prinzip der Diazoreaktion durch Oxydation erhaltene Farbstofflösung, die ich auf Grund meiner Ergebnisse gleichfalls als Urochromlösung bezeichne, lassen sich mit verdünnten Echtgelblösungen gut vergleichen. Die Echtgelblösung erscheint daher zur vergleichend-colorimetrischen Bestimmung des Urochroms verwendbar.

V. Colorimetrische Schätzungen des Urochroms.

Um der Beziehung zwischen der Ehrlichschen Diazoreaktion und dem Urochromogengehalt des Harnes auch zahlenmäßig Ausdruck zu geben, habe ich eine Reihe von normalen und pathologischen Harnen colorimetrisch auf ihren Gehalt an Urochrom durch Vergleich mit einer verdünnten Echtgelblösung untersucht.

Die Echtgelblösung (Müller, Leipzig) wurde folgendermaßen bereitet: 1 g Echtgelb wurde in 500 ccm dest. Wasser gelöst. Es löste sich vollständig auf. Die Farbe der Lösung war dunkelorangerot. Von dieser Lösung wurden 10 ccm auf 100, davon wieder 20 ccm auf 800 Wasser verdünnt. Die letzte Verdünnung zeigte hellgelbe Farbe mit grünlichem Stich, wie es auch Klemperer für seine Echtgelblösungen angibt. Dieser Farbenton kommt nach Klemperer auch dem von ihm dargestellten Urochrom zu. Meine zum Vergleich herangezogene Echtgelblösung enthielt 0,1 g Echtgelb auf 20 l Wasser. Die in 100 ccm dieser Lösung enthaltene Farbstoffmenge wurde 100 gleichgesetzt.

Zur colorimetrischen Bestimmung wurde jeder Harn zunächst in der Weise mit Ammoniumsulfat ausgefällt, daß zu 25 ccm desselben etwa 20 g feinpulverisierten Ammoniumsulfats hinzugefügt wurden. Unter häufigem Umrühren mit einem Glasstab löste sich darin der größte Teil des Ammoniumsulfats. Nach etwa $^1/_2$stündigem Stehen hatten sich dem Urochrom beigemengte anderweitige Farbstoffe (Urobilin und Urobilinogen, Hämatoporphyrin, Uroerythrin) abgeschieden. Hierauf wurde mit einer heißgesättigten Ammoniumsulfatlösung auf 50 ccm aufgefüllt und der Harn so auf das doppelte Volumen verdünnt. Nach der Filtration waren früher sehr verschieden gefärbte Harne sowohl untereinander wie auch mit der Echtgelblösung meist gut vergleichbar geworden.[1]) Es wurden nun in die beiden Zylinder des Dubosqcolorimeters 10 ccm der obigen Echtgelblösung und 10 ccm des in der angegebenen Weise mit Ammoniumsulfat ausgefällten Harnes gebracht, auf gleiche Farbenintensität eingestellt und das Verhältnis abgelesen. Bei von Haus aus sehr farbstoffarmen Harnen muß vorher durch Eindampfen auf dem Wasserbade konzentriert werden. Diese

[1]) In manchen Fällen war jedoch die colorimetrische Bestimmung durch zu starke, vom Pigmente Dombrowskis herrührende bräunliche Färbung erschwert. In diesen Fällen habe ich versucht, durch Fällung mit neutr. Bleiacetat bei schwach saurer Reaktion dieses Pigment zu beseitigen, was mir auch gelang. Als ich jedoch die Bleiacetatfällung mit der Ammoniumsulfataussalzung kombinieren wollte, ergab sich, daß der Zusatz von Ammoniumsulfat zu einem mit neutr. Bleiacetat schon ausgefällten Harne einen geringen Verlust an normalem gelbem Harnfarbstoff zur Folge hatte. Ob dies wirklich oder scheinbar durch die geänderte Reaktion der Flüssigkeit bedingt war, konnte ich nicht mit Sicherheit entscheiden.

Konzentration ist natürlich bei der Berechnung mit zu berücksichtigen. Im allgemeinen war ein Konzentrieren nicht oft notwendig. Die Verhältniszahl zwischen Harnfarbe und Echtgelblösung wurde entsprechend der vorhergegangenen 2maligen Verdünnung mit 2 multipliziert und der Farbstoffgehalt der Tagesmenge des Harnes in Echtgelb-Einheiten ausgedrückt.

Z. B. hatte ein normales Individuum 900 ccm Tagesmenge Harn. Die Colorimetrie ergab das Verhältnis von Harn zur Echtgelblösung = 20:22 resp. der Farbstoffgehalt des Harns betrug $\frac{20}{22}$ der Echtgelblösung oder wegen der Verdünnung $\frac{20 \cdot 2}{22}$. Für die Tagesmenge von 900 somit $\frac{20 \cdot 2 \cdot 900}{22} = 1634$ Einheiten Echtgelb.

Die Harnmenge eines Tuberkulösen ohne Diazoreaktion betrug an einem Tage 1200 ccm. Das Verhältnis des in der angegebenen Weise behandelten Harnes zur Echtgelblösung war 20:12. Der Farbstoffgehalt der Tagesmenge war somit $\frac{20 \cdot 2 \cdot 1200}{12} = 4000$ Einheiten.

Die Tagesmenge Harn bei einem Patienten mit Schrumpfniere war 800 ccm. Der Harn, äußerst blaß, wurde vorher auf dem Wasserbade auf $^1/_3$ seines Volumens eingedampft. Die colorimetrische Bestimmung ergab das Verhältnis 18:20. Die Tagesmenge des Urochroms als Echtgelb ausgedrückt betrug somit $\frac{18 \cdot 2 \cdot 800}{20 \cdot 3} = 480$.

Die Berechnung des Urochromogens geschah auf folgende Weise: Der Harn wurde zunächst auf die Diazoreaktion geprüft. Dies geschah entweder nach Ehrlichs Vorschrift oder direkt in der von mir angegebenen Weise[1]) mittels einer $1\,^0/_{00}$igen Kaliumpermanganatlösung, indem zu dem 3mal verdünnten Harn in einer Eprouvette 3 Tropfen von dieser Lösung hinzugefügt wurden. Das Auftreten einer deutlich gelben Färbung zeigte die Anwesenheit des Urochromogens an. War die Reaktion negativ, dann trat keine Gelbfärbung auf, sondern entweder keine Farbenveränderung oder eine leichte Bräunung.

In einer früheren Arbeit[2]) habe ich darüber berichtet, daß manche Harne im frischen Zustande keine, dagegen nach 24stündigem Stehen im Brutschrank ausgesprochene Diazoreaktion zeigen. Die dieser Reaktion

[1]) Med. Klinik, 1910, Nr. 42.
[2]) Med. Klinik, 1910, Nr. 22.

zugrunde liegende Substanz ist, da sie sich gleichfalls durch Zusatz einer verdünnten Permanganatlösung in einen gelben Farbstoff umwandeln läßt und entsprechend ihren verwandtschaftlichen Beziehungen zur Ehrlichschen Diazoreaktion von mir gleichfalls als Urochromogen bezeichnet worden, und zwar zum Unterschiede von dem Urochromogen β, das die Ehrlichsche Diazoreaktion bewirkt, als Urochromogen α. Urochromogen α ist durch Stehen im Brutschrank in Urochromogen β überführbar. Colorimetrisch verhält sich der aus Urochromogen α durch Zusatz von Oxydationsmitteln gewonnene Farbstoff genau so wie der aus Urochromogen β auf dieselbe Weise erhaltene. Es ist daher möglich, auch die Vorstufe des Prinzips der Ehrlichschen Diazoreaktion als Urochrom colorimetrisch zu bestimmen. In meiner früheren Arbeit habe ich darauf hingewiesen, daß die Inkonstanz von Ehrlichs Diazoreaktion bei schwerer Lungentuberkulose ihren Grund im Auftreten des Urochromogens α hat. Die Anwesenheit dieses Körpers läßt sich leicht erschließen, wenn man bei negativer Diazoreaktion eine positive Permanganatprobe erhält. Semiotisch sind beide Substanzen gleichwertig und ihre Bestimmung auf colorimetrischem Wege durch Überführung in Urochrom daher nebeneinander durchführbar.

Nach der Feststellung, daß der Harn Urochromogen enthält, versetzt man 25 ccm desselben unter öfterem Umschütteln tropfenweise mit einer $1\,^0/_{00}$igen Permanganatlösung[1]) so lange, als noch eine deutliche Zunahme der Gelbfärbung zu sehen ist. Dies erkennt man leicht an der oberen Grenze der Flüssigkeit, wo sich das Permanganat mit dieser vermischt. Die zuzusetzende Menge schwankt etwa zwischen 10 und 30 Tropfen der $1\,^0/_{00}$igen Permanganatlösung. Ein Überschuß des Reagens ist zu vermeiden, weil der Harn dadurch einen bräunlichen Stich erhält, der das colorimetrische Vergleichen erschwert. Man kann auch so verfahren, daß man so lange die Permanganatlösung zusetzt, bis die Ehrlichsche Diazoreaktion eben anfängt negativ zu werden. Hierauf verfährt man, wie früher angegeben,

[1]) Man kann durch das farblose Kaliumpersulfat ($5\,^0/_0$ige Lösung) dasselbe erzielen. Doch muß man eine größere Quantität zusetzen. Auch tritt das Maximum der Gelbfärbung langsamer ein als mit Permanganat.

indem man zu 25 ccm Flüssigkeit etwa 20 g Ammoniumsulfat hinzufügt, umrührt, nach $^1/_2$ Stunde filtriert, auf 50 ccm mit konz. Ammoniumsulfatlösung auffüllt und colorimetriert. Da durch das Hinzufügen der Permanganatlösung das vorhandene Urochromogen in Urochrom umgewandelt wurde, so ergibt die Differenz des Urochromgehaltes nach der Oxydation gegenüber dem Urochromgehalte vor der Oxydation den Urochromogengehalt. Diese Differenz ist also ein direktes Maß für die Ehrlichsche Diazoreaktion. Z. B. betrug die Tagesmenge Harn eines Schwertuberkulösen 700 ccm, Diazoreaktion pos. 4 nach Ehrlich. Urochromgehalt der Tagesmenge 2583. Urochromgehalt nach Zusatz der Permanganatlösung 8610. Der Urochromogengehalt betrug also $8610 - 2583 = 6027$.

Die colorimetrische Untersuchung der Harne mit positiver Diazoreaktion in der angegebenen Weise ergibt, daß zwischen der Intensität der Diazoreaktion nach Ehrlich und der Zunahme des Urochromgehaltes durch die Oxydation eine direkte Proportionalität besteht. Wir haben somit durch diese Methode eine quantitative Schätzungsmöglichkeit für das in solchen Harnen enthaltene Urochromogen gewonnen. Die colorimetrische Untersuchung normaler Harne, die genau in derselben Weise mit Kaliumpermanganat behandelt wurden, zeigte keine Zunahme des Urochromgehaltes. (Bräunliche Färbung der Flüssigkeit kann manchmal eine geringfügige Zunahme vortäuschen, doch darf nur ausgesprochene Gelbfärbung als Urochromogen gedeutet werden.)

Die Mehrzahl der von mir auf ihren Urochromogengehalt geprüften Harne stammte von Schwertuberkulösen. Außerdem wurden aber auch die Harne von an Sepsis, Pneumonie und Carcinom Erkrankten untersucht. Es ergab sich dieselbe Beziehung zwischen Ehrlichscher Diazoreaktion und Urochromogengehalt wie bei der Phthise.

Die Resultate von in dieser Weise vorgenommenen Urochrom- und Urochromogenbestimmungen von 71 normalen und pathologischen Fällen mit und ohne Ehrlichsche Diazoreaktion sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle.

Diagnose und Alter	Harnmenge ccm	Temperatur	Urochrom in 100 ccm	Urochrom Tagesmenge	Urochromogen in 100 ccm	Urochromogen Tagesmenge	Urochr. + Urochromogen in 100 ccm	Urochr. + Urochromogen Tagesmenge	Diazo-R.	Anmerkung
1. Sepsis, 30 J.	700	Fieber	369	2583	861	6027	1230	8610	pos. 4	
2. Tabes dors., 28 J.	900	⊥	111	999	—	—	—	—	∅	
3. Ca. ventr.?, 65 J.	500	⊥	65	325	—	—	—	—	∅	Ascites.
4. Serositis tbc.?, 23 J.	600	⊥	130	780	—	—	—	—	∅	F=hoh. Fieb.
5. Pneumothorax, 15 J.	650	F	184	1196	—	—	—	—	∅	
6. Neuritis, 25 J.	1200	⊥	104	1248	—	—	—	—	∅	
7. Hysterie, 27 J.	1000	⊥	162	1620	—	—	—	—	∅	
8. Tbc. pulm. I. Stad., 23 J.	800	⊥	156	1248	—	—	—	—	∅	
9. Eig. Harn, 33 J.	900	⊥	156	1404	—	—	—	—	∅	
10. Tbc. pulm. III. Stad., 40 J.	1100	⊥	156	1716	—	—	—	—	∅	
11. Eig. Harn,	850	⊥	148	1258	—	—	—	—	∅	
12. Mitr. Insuff, 36 J.	800	⊥	104	832	—	—	—	—	∅	
13. Rekonv. nach Typhus, 28 J.	800	⊥	80	640	—	—	—	—	∅	
14. Sepsis, 36 J.	1000	F	95	950	—	—	—	—	∅	
15. Paraplegie, 47 J.	1300	⊥	66	858	—	—	—	—	∅	
16. Cholelithiasis, 67 J.	650	⊥	160	1040	—	—	—	—	∅	
17. Vit. cord., 32 J.	750	⊥	111	832	—	—	—	—	∅	
18. Eig. Harn	900	⊥	150	1350	—	—	—	—	∅	
19. Nephritis chron., 51J.	1000	⊥	100	1000	—	—	—	—	∅	
20. Dolores ventr., 35 J.	1400	⊥	71	994	—	—	—	—	∅	
21. Pleuritis, 32 J.	1000	F	332	3320	—	—	—	—	∅	
22. Sepsis, 40 J.	1000	F	190	1900	476	4760	666	6660	pos. 4	
23. Skorbut, 44 J.	900	⊥	200	1800	—	—	—	—	∅	
24. Diabetes, 42 J.	1800	f	82	1476	—	—	—	—	∅	f = leicht. Fieber
25. Tbc. pulm. I. Stad., 25 J.	1000	⊥	362	3620	—	—	—	—	∅	
26. Tbc. p. III. Stad., 32J.	900	F	222	1998	278	2502	500	4500	pos. 3	
27. do. 25J.	1000	F	266	2660	214	2140	480	4800	„	
28. do. 23J.	800	f	500	4000	832	6656	1332	10656	„ 5	
29. Pneumonie	1000	F	306	3060	194	1940	500	5000	„ 3	
30. Tbc. p. III. Stad., 32J.	1000	⊥	200	2000	—	—	—	—	∅	
31. do. 21J.	900	F	570	5060	430	3870	1000	9000	D.-R. anfangs ∅, im Brutschrank pos. 4	
32. do. 25J.	1000	F	266	2660	134	1340	400	4000	„ 3	
33. Tb. I. Stad., 43 J.	900	⊥	266	2394	—	—	—	—	∅	
34. Ca. ventr., 56 J.	800	⊥	200	1600	—	—	—	—	∅	Störender bräunlicher Farbenton. Bestimmungen daher ungenau
35. „ oesoph., 53 J.	900	⊥	200	1800	—	—	—	—	∅	
36. „ ves. urin., Kachexie, 58 J.	700	⊥	350	2450	700	4900	1050	7350	pos. 4	
37. Tbc. p. III. St., 32J.	800	F	352	2816	314	2512	666	5328	„ 3	
38. do. 41J.	1000	F	200	2000	370	3700	570	5700	„ 4	

Tabelle (Fortsetzung).

Diagnose und Alter	Harnmenge ccm	Temperatur	Urochrom		Urochromogen		Urochr. + Urochromogen		Diazo-R.	Anmerkung
			in 100 ccm	Tagesmenge	in 100 ccm	Tagesmenge	in 100 ccm	Tagesmenge		
39. Tbc. p. I. Stad., 26 J.	1300	⊥	122	1586	—	—	—	—	—	
40. do. III. „ 28 J.	1000	F	332	3320	334	3340	666	6660	pos. 3	
41. do. I. „ 26 J.	1000	⊥	154	1540	—	—	—	—	∅	
42. do. Nr. 40, später untersucht	1000	⊥	400	4000	—	—	—	—	∅	
43. Tbc. pulm. II. Stad., 18 J.	1000	⊥	234	2340	—	—	—	—	∅	
44. Eig. Harn	900	⊥	150	1350	—	—	—	—	∅	
45. Cat. ventr., 34 J.	800	⊥	266	2128	—	—	—	—	∅	
46. Tbc. pulm. III. Stad., 32 J.	800	f	500	4000	832	6656	1332	10656	pos. 5	
47. Ca. oesoph., 57 J.	1100	⊥	160	1760	—	—	—	—	∅	
48. Bronchiektas., 27 J.	1000	f	266	2660	—	—	—	—	∅	
49. Tbc. pulm. II. Stad., 28 J.	1000	⊥	234	2340	—	—	—	—	∅	
50. Tbc. pulm. I. Stad., 26 J.	1100	⊥	160	1760	—	—	—	—	∅	
51. Appendic. chron., 28 J.	1200	⊥	140	1680	—	—	—	—	∅	
52. „	1100	⊥	142	1562	—	—	—	—	∅	
53. Typh. abdom., 34 J.	1200	f	250	3000	—	—	—	—	∅	
54. Eig. Harn	1000	⊥	137,5	1375	—	—	—	—	∅	
55. Nephr. chron., 56 J.	800	⊥	60	480	—	—	—	—	∅	Schrumpfniere
56. Carc. pyl., 53 J.	1200	⊥	105	1260	—	—	—	—	∅	
57. Rekonvaleszent nach Rheumat. artic., 26 J.	1400	⊥	90	1260	—	—	—	—	∅	
58. do.	1300	⊥	100	1300	—	—	—	—	∅	
59. do.	1350	⊥	95	1282	—	—	—	—	∅	
60. Gesund. Mann, 31 J.	1050	⊥	135	1417	—	—	—	—	∅	
61. do. 22 J.	1400	⊥	80	1120	—	—	—	—	∅	
62. Herzfehler, 19 J.	800	⊥	175	1400	—	—	—	—	∅	
63. Myodeg. cord., Leberverfettung, 59 J.	2000	⊥	119	2380	—	—	—	—	∅	
64. Rheum. art. chron.	1000	⊥	154	1540	—	—	—	—	∅	
65. Ulc. ventr., 38 J.	1400	⊥	105	1470	—	—	—	—	∅	
66. Carc. oesoph., 70 J.	700	⊥	233	1631	514	3598	747	5229	pos. 3	
67. Arterioskler., 58 J.	1300	⊥	77	1001	—	—	—	—	∅	
68. Gesunder Mann, 30 J.	800	⊥	215	1720	—	—	—	—	∅	
69 Bronch. chron., 79 J.	600	⊥	155	930	—	—	—	—	∅	
70. Rheum. artic. gonorrh., 28 J.	2000	F	186	3720	—	—	—	—	∅	
71. Cirrhos. hep. et Nephr. chron., 50 J.	1300	⊥	77	1001	—	—	—	—	∅	

Der bei normalen Fällen gefundene Urochromgehalt zeigt relativ geringe Schwankungen. Die Zahl meiner Bestimmungen ist noch zu klein, um daraus bindende Schlüsse ziehen zu können. Es ist jedoch nicht uninteressant, zu sehen, daß wir

es hier mit einer wenigstens bei ein und demselben Individuum recht konstanten Größe zu tun haben. Mein eigener Harn zeigte in 5 verschiedenen Bestimmungen folgende Tageswerte: 1404, 1258, 1350, 1350, 1375, im Mittel 1347. Ein anderer normaler Fall zeigte in 3 Bestimmungen: 1260, 1300, 1282, im Mittel also 1280 Einheiten. Andere normale Werte waren: 1120, 1417, 1720. Die normalen Werte stehen einander daher nicht nur bei einem und demselben, sondern auch bei verschiedenen Individuen verhältnismäßig sehr nahe.

Beim Carcinom habe ich, solange Kachexie fehlte, keine Vermehrung des Urochroms beobachten können; wenn Kachexie eintrat, habe ich Erhöhung der Urochromwerte gefunden. In einer früheren Arbeit habe ich konstatiert, daß bei schweren Fällen von Lungentuberkulose, namentlich solchen mit stark positiver Diazoreaktion, ähnlich hohe Prozentwerte des Neutralschwefels gefunden werden können wie beim Carcinom. Es liegt nahe, mit Rücksicht auf den hohen Urochrom- und Urochromogengehalt der Harne von Schwertuberkulösen diese Vermehrung des Neutralschwefels auf die vermehrte Ausscheidung dieser Substanzen zurückzuführen. Da eine ähnlich vermehrte Urochromausscheidung beim Carcinom nicht zur Regel gehört, so scheint die relative Vermehrung des Neutralschwefels, die beim Carcinom von mir beobachtet wurde, auf eine andere Proteinsäure als das Urochrom und seine Vorstufen zurückzuführen zu sein.

Die auch sonst über die Ausscheidung des normalen gelben Harnfarbstoffs bekannten Tatsachen ließen sich auch bei den colorimetrischen Bestimmungen wieder feststellen. Sehr geringe Tagesausscheidung in einem Falle von Schrumpfniere (480 Einheiten), geringe Ausscheidung in einem Falle von Typhusrekonvaleszenz (640); hohe Ausscheidung bei fieberhaften Krankheiten, auch wenn keine positive Diazoreaktion vorhanden war. Nicht in allen Fällen von Fieber ist jedoch vermehrte Urochromausscheidung vorhanden. So zeigte ein Fall von Sepsis (Nr. 14 der Tabelle) trotz hohen Fiebers nur eine Tagesausscheidung von 950.

Was die Lungentuberkulose betrifft, so ließ sich feststellen, daß im Anfangsstadium derselben, solange noch kein Fieber vorhanden ist, die Urochromwerte normal oder erhöht

sein können. Dagegen war bei fortgeschrittenen Stadien häufig auch ohne positive Diazoreaktion vermehrte Urochromausscheidung zu konstatieren. Es wäre möglich, daß sich aus der erhöhten Urochromausscheidung in fieberhaften Krankheiten, im besonderen bei der Lungentuberkulose prognostische Schlüsse ableiten ließen. Dieser Gedanke liegt um so näher, als man häufig bei der Lungentuberkulose vermehrte Urochromausscheidung vor dem Auftreten der Ehrlichschen Diazoreaktion und vikariierend mit derselben beobachten kann. Vermehrte Urochromausscheidung wurde bei der Lungentuberkulose schon von Clemens[1]) konstatiert.

Die dem Harne zukommende Grundfarbe bzw. sein Urochromgehalt scheint von der Nahrungsaufnahme ganz unabhängig zu sein. Auch der Harn von Hungernden ist gelb. Klemperer betont, daß sich zwischen der Ausscheidung des Urochroms und der Nahrungsaufnahme keinerlei Beziehungen ergeben haben. Auch mir ist ein Zusammenhang zwischen der Urochromausscheidung und der Nahrungsaufnahme nicht aufgefallen.

Ziehen wir das, was über die Ehrlichsche Diazoreaktion, deren Prinzip nach allen bisherigen Untersuchungen nur dem Körpereiweißzerfalle entstammen kann, bekannt ist, hier mit in Betracht, so ergibt sich, daß das Urochrom und seine Vorstufen nur den Gewebseiweißzerfall anzeigen können. Das Vorhandensein einer stark positiven Diazoreaktion durch viele Tage bei Kranken mit Meningitis tuberculosa trotz vollständigen Fehlens jeder Nahrungsaufnahme, erlaubt keine andere Deutung. Auch die Tatsache, daß das Urochrom im allgemeinen bei fieberhaften Krankheiten vermehrt ausgeschieden wird, bei denen ja in der Regel infolge der gleichzeitigen Appetitlosigkeit weniger Nahrung als normal aufgenommen wird und bei denen ein erhöhter Körpereiweißzerfall mit Sicherheit festgestellt ist, läßt eine Beziehung der Urochromausscheidung zur Nahrungsaufnahme von vornherein als unwahrscheinlich erscheinen. In einer früheren Arbeit habe ich gezeigt, daß bei der Lungentuberkulose der Neutralschwefel absolut und relativ vermehrt ausgeschieden wird. Auch dies konnte ich auf den gesteigerten Körpereiweißzerfall zurückführen.

[1]) In Ott, Die chem. Pathol. d. Lungentuberk.

Der schwer Tuberkulöse — und das gilt für alle Krankheiten, die mit positiver Diazoreaktion einhergehen — baut aber sein Organeiweiß nicht nur quantitativ vermehrt ab, sondern dieser Abbau erfolgt auch zum Teile qualitativ abweichend von der Norm. Die Zustände, die mit positiver Diazoreaktion einhergehen, kann man im weitesten Sinne des Wortes als toxische auffassen. Die Hauptrolle spielen Bakterientoxine. Der Einfluß der Bakteriengifte äußert sich sonach in schwereren Fällen in der Weise, daß der Oxydationsvorgang, der normal zur Bildung des Urochroms führt, gestört wird. Als Ausdruck dieser Störung erscheint die niedrigere Oxydationsstufe dieses Körpers, das Urochromogen, im Harne.

VI. Abstammung des Urochroms und seiner Vorstufen.

Man war früher geneigt, das Urochrom als Abkömmling des Blutfarbstoffes anzusehen.

So meint Vogel, daß uns die Bestimmung des Harnfarbstoffes einen Einblick in den Stoffwechsel der Erythrocyten erlaube. Er beruft sich auf Scherer, Polli, Virchow und Harley, die teils den Gallen-, teils den Harnfarbstoff, teils beide als Derivate des Hämatins betrachteten. Auch Thudichum[1]) war wenigstens in seinen ersten Arbeiten geneigt, das Urochrom als Abkömmling des Blutfarbstoffes anzusehen, gab jedoch später diesen Standpunkt auf. Durch Garrod schien der Beweis erbracht zu sein, daß das Urochrom dem Hämatin entstamme. Garrod gab an, daß es ihm gelungen sei, durch aktiven Aldehyd aus Urochrom Urobilin darzustellen. Diese Angabe Garrods zusammen mit einer Angabe Rivas, daß es umgekehrt gelinge, durch Oxydation des Urobilins einen dem Urochrom entsprechenden Körper zu erhalten, war nebst klinischen Erwägungen auch für mich der Grund, in meiner ersten Arbeit über das Urochromogen als Ursache der Ehrlichschen Diazoreaktion in diesem Körper ein Stoffwechselprodukt der roten Blutkörperchen zu sehen. Klemperer faßt das Urochrom auch als Stoffwechselprodukt der Erythrocyten auf, das in der Niere gebildet wird. Chiodera konstatierte, daß ebenso wie beim Urobilin sich auch beim Urochrom Beziehungen zur Zerstörung der roten Blutkörperchen feststellen lassen.

Ich habe, diesem Gedankengang folgend, die Urochromfraktion des Harnes hydrolysiert, um zu sehen, ob etwa ein höherer Histidingehalt, der für die Eiweißkomponente des Hämoglobins, das Globin charakte-

[1]) Die Literatur über das Urochrom ist in meiner Arbeit in Beitr. z. Klin. d. Tub. 8, 177, 1907 angeführt.

ristisch ist, darin zu finden wäre. Es wurde in der Tat in dieser Fraktion eine starke Diazoreaktion nach Pauli gefunden, die, da die Millonsche Reaktion negativ war, nicht auf Tyrosin, sondern nur auf Histidin bezogen werden konnte.

Diese Tatsache bewog mich, das Blut von Schwertuberkulösen mit starker Diazoreaktion daraufhin mikroskopisch zu untersuchen, ob sich hier Anhaltspunkte für einen so stark vermehrten Zerfall, wie er zur Erklärung der starken Urochromausscheidung in diesen Fällen vorhanden sein mußte, finden ließen. Ich habe jedoch bei den verschiedenartigsten Färbungen von Blutausstrichen solcher Kranker keine derartigen Veränderungen konstatieren können, daß ein Schluß auf eine so starke Einschmelzung der Erythrocyten gestattet gewesen wäre.

Um jedoch in diese Verhältnisse einen sichereren Einblick zu erhalten, war es notwendig, sich eine Vorstellung von dem Blutfarbstoffumsatze bei schwer Tuberkulösen zu verschaffen. Ich habe daher mittels einer noch zu veröffentlichenden Methode der Urobilinbestimmung vergleichende Untersuchungen über die Menge des im Harne und im Stuhle zusammen ausgeschiedenen Urobilins bei Gesunden und bei Tuberkulösen mit positiver Diazoreaktion angestellt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß der schwer Tuberkulöse nicht nur nicht mehr Erythrocyten als der Gesunde abbaut, sondern eher weniger. Während nach meinen Bestimmungen bei Gesunden durchschnittlich etwa 400 mg Urobilin im Stuhl und im Harn täglich ausgeschieden wird, betrug in einem Falle von Tuberkulose mit positiver Diazoreaktion im Durchschnitt von 7 Tagen die Urobilinausscheidung nur 290 mg.

Auf Grund dieser Feststellungen dürfte zwischen der Urochrom- bzw. Urochromogenausscheidung und dem Abbau des Hämoglobins kein direkter Zusammenhang bestehen. Wenn wir jedoch das Urochrom und seine Vorstufen auf Grund unserer bisherigen Ergebnisse als Derivate des Organeiweißzerfalles ansehen, wenn wir weiterhin die relative Konstanz der Urochromausscheidung beim Gesunden, seine Beziehungen zum vermehrten Gewebseiweißzerfalle beim Fiebernden in Betracht ziehen, wenn wir fernerhin berücksichtigen, daß alle Versuche, das Prinzip der Ehrlichschen Diazoreaktion mit einem bestimmten Organ und seinem Zerfalle in Zusammenhang zu bringen, fehlgeschlagen sind, so bleibt meines Erachtens nur die Möglichkeit übrig, daß wir das Urochrom und seine Vorstufen schlechthin als Derivate des Protoplasmaeiweißzerfalles des gesamten Organismus ansehen. Die Untersuchungen beim Carcinom, die trotz normaler Urochromausscheidung einen relativ vermehrten Neutralschwefelgehalt ergeben haben, scheinen darauf hinzuweisen, daß neben dem normalen gelben Harnfarbstoffe

noch ungefärbte Proteinsäuren dem Organeiweißzerfalle entstammen dürften.

Von dem Gesichtspunkte aus, daß das Urochrom und seine Vorstufen mit dem Protoplasmaeiweißzerfall des Körpers zusammenhängen, lassen sich die über diese Körper bekannten Tatsachen einheitlich erklären: Die relative Konstanz der Ausscheidung des Urochroms unter normalen Verhältnissen, die Unabhängigkeit von der Nahrungsaufnahme, seine vermehrte Ausscheidung in fieberhaften Krankheiten, seine Verminderung bei Rekonvaleszenten nach solchen Krankheiten [bei denen ja eine starke Einschränkung des Stoffwechsels bekannt ist und bei denen auch von Benedikt[1]) eine auffallend geringe Neutralschwefelausscheidung konstatiert wurde]. Seine verminderte Ausscheidung bei schweren Nierenaffektionen ist ohne Zwang auf die auch für andere Stoffwechselprodukte, z. B. Harnstoff, bekannte Tatsache der behinderten sekretorischen Tätigkeit der Niere in solchen Zuständen zurückzuführen. Das Auftreten der Vorstufen des Urochroms erklärt sich aus toxischen Einwirkungen auf die Zellen des Organismus, die zur Bildung ungenügend oxydierter Stoffwechselprodukte derselben führen.

Was die Frage der chemischen Stellung des Urochroms betrifft, so legt die Übereinstimmung hinsichtlich der Fällungsreaktionen, zusammengehalten mit den Literaturangaben über das Prinzip der Diazoreaktion, sowie insbesondere auch der Parallelismus zwischen Urochromogengehalt und Neutralschwefelausscheidung die Annahme der Proteinsäurenatur des Urochroms nahe. Der Umstand jedoch, daß Hohlweg, Salomonson und Mancini[2]) im Laboratorium Hofmeisters schwefelfreie Urochrompräparate isoliert haben, läßt eine bestimmte Behauptung in dieser Hinsicht als voreilig erscheinen. Vielleicht wäre eine Aufklärung dieses Widerspruches auch in der Richtung denkbar, daß sich in der Proteinsäurefraktion des Harnes neben schwefelhaltigen Bruchstücken des Eiweißmoleküls auch schwefelfreie vorfinden. Jedenfalls aber muß die Frage der chemischen Stellung des Urochroms so lange für offen gelten, als die Reindarstellung dieser Substanz noch nicht gelungen ist.

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 36, 281, 1899.

[2]) Diese Zeitschr. 13, 199, 205, 208, 1908.

Zusammenfassung. (Siehe auch das Schema S. 338.)

1. Der normale gelbe Harnfarbstoff oder das Urochrom im Sinne von Thudichum und Garrod ist neben dem Urochrom Dombrowski in der durch Bleiessig fällbaren Proteinsäurefraktion enthalten.

2. Das Urochrom Dombrowski ist mit dem normalen gelben Harnfarbstoff nicht identisch und durch die Unlöslichkeit seines Bleisalzes in verdünnter Essigsäure von dem letzteren trennbar.

3. Die Ursache der Ehrlichschen Diazoreaktion ist eine in ihren Fällungsreaktionen mit den Proteinsäuren übereinstimmende Substanz unbekannter Natur, die ihren Eigenschaften entsprechend als Urochromogen bezeichnet werden kann.

4. Außer dem diese Reaktion gebenden Urochromogen (β) kommt noch ein zweites Urochromogen (α) vor, das an sich keine Diazoreaktion gibt, wohl aber nach dem Stehen im Brutschranke.

5. Beide Chromogene können durch Oxydation in Urochrom übergeführt werden.

6. Der Vergleich des mit Ammoniumsulfat ausgefällten Harnes mit einer Echtgelblösung erlaubt eine colorimetrische Schätzung des Urochroms und seiner Vorstufen vorzunehmen.

7. Das Urochrom und seine Vorstufen scheinen dem Protoplasmaeiweißzerfalle zu entstammen.

8. Das Auftreten der Vorstufen des Urochroms im Harne ist als Zeichen einer toxischen Stoffwechselstörung im Organismus aufzufassen.

Über den Einfluß inaktiver Substanzen auf die Rotation der Lävulose.

Von

Neumann Wender.

(Aus der k. k. Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Czernowitz.)

(Eingegangen am 16. Dezember 1910.)

Über den Einfluß inaktiver Substanzen auf die Rotation der Lävulose liegen nur wenige Angaben vor.

Es ist dies wohl darauf zurückzuführen, daß bis vor kurzem reine Lävulose nur schwer darzustellen war.

Die älteren Angaben über die Drehung der Lävulose sind zumeist wertlos, weil sie entweder mit ungenauen Apparaten erhalten wurden, oder, selbst wenn genaue Apparate zur Verfügung standen, doch die zu den Versuchen benutzte Lävulose von zweilfelhafter Reinheit war. Es geht dies am besten daraus hervor, daß über das spezifische Drehungsvermögen der Lävulose die widersprechendsten Angaben gemacht wurden.[1]) Genauere Versuche wurden erst 1886 von Herzfeld und Winter[2]) ausgeführt, die für die Lävulose in wässeriger Lösung die spezifische Drehung bestimmten und folgende Werte fanden:

$$\text{bei } P = 20{,}071,\ [\alpha]_D^{20} = -71{,}48,$$

$$\text{bei } P = 20{,}197,\ [\alpha]_D^{20} = -71{,}43.$$

Auch diese Angaben wurden später von Hönig und Jesser[3]) richtig gestellt. Diese haben nach einem besonderen Verfahren reine krystalli-

[1]) Eine ausführliche Zusammenstellung über die verschiedenen in der Literatur zerstreuten Angaben, betreffend das spezifische Drehungsvermögen der Lävulose, hat O. v. Lippmann in seiner Chemie der Zuckerarten, Braunschweig 1904, veröffentlicht.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1886, 390 und Annal. 245, 2[illegible].

[3]) Monatsh. f. Chem. 9, 562.

sierte, wasserfreie Lävulose aus Inulin gewonnen, deren optisches Verhalten in wässeriger Lösung sie studierten. Sie fanden zunächst in Übereinstimmung mit Herzfeld, daß sich das Drehungsvermögen der Lävulose mit der Temperatur stark ändere, und zwar nimmt es mit steigender Temperatur ab. Die Beziehung zwischen dem Drehungsvermögen und der Temperatur läßt sich durch die Gleichung $[\alpha]_D^t = \alpha + b \cdot t$ darstellen. Hönig und Jesser berechneten nach der Methode der kleinsten Quadrate die Werte für a uud b bei zwei verschiedenen Konzentrationen und fanden:

$$\text{für } P = 9{,}0870\ [\alpha]_D^t = -103{,}924 + 0{,}671\,42\ t,$$

$$\text{„ „ } = 23{,}4979\ [\alpha]_D^t = -107{,}651 + 0{,}691\,995\ t.$$

In der Folge haben sie für b stets den Wert 0,671 42 beibehalten.

Sie untersuchten ferner den Einfluß der Konzentration auf die optische Drehung und fanden auch hier beim Eintragen der gefundenen Werte in ein Koordinatennetz eine gerade Linie. Aus ihren Versuchsergebnissen berechneten sie als Ausdruck der Veränderlichkeit der spezifischen Drehung der Lävulose in wässeriger Lösung die Gleichung:

$$[\alpha]_D^{20} = -113{,}9635 + 0{,}258\,31\ q.$$

Berechnet man die spezifische Drehung für verschiedene Prozentgehalte, so ergibt sich nach Hönig und Jesser folgende Gleichung:

$$[\alpha]_D^{20} = -88{,}13 + 0{,}2583\ P.$$

Die auffallend großen Differenzen zwischen den von Hönig und Jesser gefundenen Zahlen im Vergleiche mit jenen von Herzfeld ermittelten, führt letzterer darauf zurück, daß er die Existenz zweier verschieden stark drehender Modifikationen der Lävulose annimmt; während Hönig und Jesser die verschiedenen Resultate damit begründen, daß der Zucker, den Herzfeld untersuchte, noch mit größeren Mengen von rechtsdrehenden Inulinderivaten verunreinigt war.

In der Folge hat Ost[1]) gleichfalls das Drehungsvermögen reiner Lävulose in wässeriger Lösung bestimmt und höhere Werte gefunden, wie Hönig und Jesser. Nach seinen sehr genau ausgeführten Untersuchungen wird die Zunahme der spezifischen Drehung in wässeriger Lösung für $P = 3$ bis 20 durch die Gleichung $[\alpha]_D^{20} = -(91{,}90 + 0{,}111\,P)$ zum Ausdruck gebracht.

Die oben erwähnten Versuche wurden stets mit Wasser als Lösungsmittel ausgeführt, und bis in die jüngste Zeit wurde nur in ganz vereinzelten Fällen der Einfluß der Gegenwart inaktiver Stoffe auf das Drehungsvermögen der Lävulose studiert. Dubrunfaut[2]), der Entdecker dieses Zuckers (1856), beobachtete zuerst, daß Salz- und Schwefelsäure schon bei gewöhnlicher Temperatur eine Erhöhung der Rotation

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 24, 1636, 1891.

[2]) Compt. rend. 42, 901.

bewirken, ebenso Oxalsäure, während Ameisensäure und Essigsäure ohne Einfluß waren.

Jungfleisch und Grimbert[1]) bestätigten diese Angaben. Nach Jodin[2]) bewirken alkalische Substanzen, wie Kalk, eine starke Verminderung der Drehung, ebenso ein Zusatz von Alkohol. Horsin-Deon[3]) behauptet dagegen, daß Zusatz von Alkohol ohne Einfluß sei, was jedoch später von Winter[4]) bestritten wurde.

Systematische Versuche über den Einfluß inaktiver anorganischer Stoffe auf die Rotation der Lävulose haben zuerst Rimbach und Weber[5]) ausgeführt. Dieselben untersuchten den Einfluß anorganischer Körper aus den verschiedenen Gruppen des periodischen Systems auf wässerige Lösungen von Lävulose und von Glucose und führten subsidiär an einem Teil dieser Lösungen auch Messungen der elektrischen Leitfähigkeit aus, um eventuell die Bildung von Molekularkomplexen oder anderer chemischer Verbindungen innerhalb der Lösungen nachzuweisen. Sie gelangten zum beachtenswerten Ergebnisse, daß durch die gleiche anorganische Substanz die Drehungen der beiden Zuckerarten zuweilen im gleichen, zuweilen im entgegengesetzten Sinne beeinflußt werden. Die Lävulose erscheint meist empfindlicher als die Glucose.

Eine Ergänzung dieser Versuche erschien mir wünschenswert. Ich habe den Einfluß einiger Säuren und Basen sowie insbesondere verschiedener organischer Verbindungen in den Bereich der Untersuchungen gezogen.

Anordnung der Versuche.

Zur Herstellung der Zuckerlösungen wurden Präparate von Kahlbaum und von Merck verwendet. Dieselben zeigten die spezifische Drehung, bei $C = 5$, $[\alpha]_D^{20} = -90{,}50$ bzw. $-91{,}12$ und können somit als rein bezeichnet werden.

Um den störenden Einfluß der Multirotation auszuschalten, wurden konzentrierte Stammlösungen hergestellt, die mindestens 24 Stunden stehen gelassen und zwischendurch polarisiert wurden, bis Konstanz der Drehung eintrat. Von dieser

[1]) Compt. rend. 108, 144.
[2]) Compt. rend. 58, 613.
[3]) Journ. de fabr. de sucre 20, 37.
[4]) Annal. 244, 310.
[5]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 51, 473, 1905.

konzentrierten Lösung wurde sodann eine bestimmte Menge in ein genau kalibriertes Maßkölbchen gebracht, die gewogene oder gemessene inaktive Substanz hinzugefügt und mit Wasser bis zur Marke gefüllt. Sämtliche Lösungen wurden bei 20° C vorgenommen.

Zur Ausführung der Versuche diente ein mit Lippichschem Polarisator versehener Halbschattenapparat neuester Konstruktion. Die Beobachtungen erfolgten in einem genau 2 dm langen, mit Wasserbadmantel versehenen Rohre bei 20° C und bei gereinigtem Natriumlicht. Die Werte stellen das Mittel aus mindestens 10 Ablesungen dar.

Einfluß von Säuren.

Zu den wenigen optisch inaktiven Stoffen, deren Einfluß auf die Rotation der Lävulose schon früher beobachtet wurde, gehören einige Säuren.

Wie schon oben erwähnt wurde, sind die ersten Mitteilungen hierüber von Dubrunfaut[1]) gemacht worden, der angibt, daß das Drehungsvermögen der Lävulose von verschiedenen Säuren, je nach ihrer Stärke im Sinne einer Zunahme modifiziert wird. Jungfleisch und Grimbert[2]) beobachteten bei Gegenwart von Mineralsäuren eine Erhöhung der Rotation ebenso bei Oxalsäure, während Ameisensäure und Essigsäure ohne Einfluß waren.

Bei diesen Versuchen handelte es sich hauptsächlich um die Frage, ob die bei der Inversion des Rohrzuckers verwendeten Säuren die Drehung des Invertzuckers beeinflussen.

Aus gleichem Anlasse untersuchte Gubbe[3]) die Einwirkung von Salzsäure und Schwefelsäure auf die Rotation des Invertzuckers und konnte die früheren Angaben, wonach diese Säuren das spezifische Drehungsvermögen des Invertzuckers erhöhen, bestätigen. Aus den Untersuchungen Gubbes geht hervor, daß der Einfluß der beiden Säuren innerhalb der Grenzen, auf die sich die Versuche erstrecken, den Mengen der Säure annähernd proportional ist und ausgedrückt werden kann durch die Gleichungen für Schwefelsäure $S = O - 5$

$$[\alpha]_D^{20} = -(19{,}983 + 0{,}16979\ S),$$

für Salzsäure $S = O - 3$

$$[\alpha]_D^{20} = -(19{,}995 + 0{,}32621\ S).$$

---

[1]) l. c.

[2]) l. c.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 18, 2214, 1885.

Da nach Jungfleisch und Grimbert[1]) Ullik[2]), Trey[3]) u. a. sowohl Salzsäure als auch Schwefelsäure auf die Rotation der Glucose ohne Einfluß sind, anderseits aus den Versuchen von Hönig und Jesser[4]), sowie von Ost[5]) zweifellos hervorgeht, daß der Invertzucker aus gleichen Teilen Glucose und Lävulose besteht und das arithmetische Mittel der spezifischen Drehungen der beiden Komponenten mit dem spezifischen Drehungsvermögen des Invertzuckers übereinstimmt, so läßt sich der Einfluß der genannten Säuren auf die Rotation der Lävulose nach der Formel:

$$[\alpha]_D^t L = 2\,[\alpha]_D^t \cdot J - [\alpha]_D^t \cdot G$$

berechnen, worin $[\alpha]_D^t \cdot G$ das nach der Formel von Ost berechnete Drehungsvermögen der Glucose für die betreffende Konzentration ist.

Es ergaben sich nachstehende Werte:

A. Salzsäure.

S	P für Invertzucker	P für Lävulose	$[\alpha]_D^{20}$ für Invertzucker	$[\alpha]_D^{20}$ für Lävulose berechnet
0,0907	9,0833	4,54165	— 19,983	— 92,562
0,4757	9,0422	4,5211	— 20,135	— 92,562
0,9793	9,0107	4,50535	— 20,334	— 93,263
2,3681	8,8990	4,4495	— 20,718	— 94,030
2,9242	8,8554	4,4277	— 20,866	— 94,325
5,0218	8,6953	4,34765	— 21,380	— 95,351

B. Schwefelsäure.

S	P für Invertzucker	P für Lävulose	$[\alpha]_D^{20}$ für Invertzucker	$[\alpha]_D^{20}$ für Lävulose berechnet
0,1008	9,0816	4,5408	— 19,971	— 92,538
0,4706	9,0518	4,5259	— 20,050	— 92,697
1,0022	9,0086	4,5043	— 20,155	— 93,106
1,4035	8,9773	4,48865	— 20,258	— 93,110
2,0520	8,9279	4,46395	— 20,350	— 93,294
4,7318	8,7158	4,3579	— 20,768	— 93,827

Der Einfluß der Säurekonzentration auf die Rotation der Lävulose im Sinne einer Erhöhung ist unverkennbar. Trägt man jedoch die berechneten Werte in ein Koordinatennetz ein, so erhält man eine ganz unregelmäßig verlaufende Linie,

[1]) Compt. rend. 1889, 108, 144.
[2]) Chem. Centralbl. 1, 433, 1892.
[3]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 22, 424, 1897.
[4]) Monatsh. f. Chem. 9, 562.
[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 24, 1636.

während diese theoretisch mit der Linie des Invertzuckers parallel laufen müßte. Diese Unregelmäßigkeit findet indes ihre Erklärung, wenn man die Tatsache berücksichtigt, daß es sich bei diesen Versuchen um die Einwirkung von Säuren auf Rohrzucker in der Wärme handelt.

Daß diese Einwirkung nicht ohne Einfluß auf die Rotation des links drehenden Komponenten ist, konnte schon Wohl[1]) beobachten, nach dessen Untersuchungen beim Erhitzen von Invertzuckerlösungen mit Säuren stets eine Verminderung der Rotation eintritt, die im wesentlichen auf eine Kondensation der Lävulose zurückzuführen ist. Es bilden sich hierbei dextrinartige Produkte. Auch Ost macht in seiner bereits zitierten Arbeit auf diesen Umstand aufmerksam, indem er ausdrücklich hervorhebt, daß die bei der Inversion von Rohrzucker mit Salzsäure dargestellten Invertzuckerlösungen stets Zersetzungsprodukte von geringerem Drehungsvermögen enthalten.

Da meines Wissens Untersuchungen über den Einfluß von Säuren auf die Rotation der Lävulose in der Kälte nicht vorliegen, habe ich einige Versuche in dieser Richtung ausgeführt, deren Ergebnisse in nachstehenden Tabellen niedergelegt sind. Bei diesen Versuchen wurde stets dieselbe Zuckermenge, jedoch wechselnde Mengen von Säuren angewendet. Eine Erwärmung der Mischung über 20° C wurde sorgfältig vermieden und die Beobachtung mindestens 1 Stunde nach erfolgter Mischung vorgenommen.

Lävulose + Salzsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Salzsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,0732	5	— 90,50	— 90,74	+ 0,24
0,7320	5	— 90,50	— 91,32	+ 0,82
1,830	5	— 90,50	— 91,70	+ 1,20

Lävulose + Schwefelsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Schwefelsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,098	5	— 90,50	— 91,80	+ 1,30
0,980	5	— 90,50	— 92,00	+ 1,50
2,45	5	— 90,50	— 93,12	+ 2,62
10,00	5	— 90,50	— 96,54	+ 6,04

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 23, 2090.

Lävulose + Phosphorsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Phosphorsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,332	5	— 90,50	— 91,72	+ 1,22
1,660	5	— 90,50	— 95,06	+ 4,56
3,320	5	— 90,50	— 99,24	+ 8,74

Der Vollständigkeit halber seien hier noch einige Versuche angeführt, die von Rimbach und Weber[1]) mit anorganischen Säuren ausgeführt wurden.

Lävulose + Arsensäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Arsensäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,542	7,20	— 91,97	— 92,51	+ 1,54
2,71	7,20	— 91,97	— 93,65	+ 1,68
5,42	7,20	— 91,97	— 94,18	+ 2,21

Lävulose + Borsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Borsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
1,254	7,20	— 91,97	— 91,14	— 0,83
2,494	7,20	— 91,97	— 91,80	— 0,03
4,954	7,20	— 91,97	— 92,10	+ 0,13

Lävulose + Molybdänsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Molybdänsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,648	7,20	— 91,97	— 87,90	— 4,07
1,296	7,20	— 91,97	— 84,10	— 7,87

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß die meisten anorganischen Säuren eine erhebliche Zunahme der Rotation bewirken, die der Säuremenge proportional ist. Eine Ausnahme macht die Borsäure, die bei kleineren Mengen eine Abnahme, bei größeren jedoch eine geringe Zunahme der Ro-

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 51, 473, 1905.

tation verursacht. Eine starke Abnahme ist nur bei Gegenwart von Molybdänsäure zu beobachten.

Von den organischen Säuren wurde von Gubbe[1]) die Oxalsäure zur Inversion des Rohrzuckers empfohlen, von der er behauptet, daß sie auf die Drehung des Invertzuckers ohne Einfluß sei. Jungfleisch und Grimbert[2]) fanden schon früher, daß Oxalsäure die Rotation des Invertzuckers verstärke, ebenso Wohl[3]).

Um diese widersprechenden Angaben aufzuklären, stellte Ost[4]) neue Versuche an, indem er reine Lävulose in 13%iger Lösung allein $^1/_2$ Stunde im Wasserbade erhitzte und auf 20° C abgekühlt polarisierte; ferner eine gleiche Zuckerlösung mit 0,25% Oxalsäure 15 Minuten auf 100° C erhitzte und dann abgekühlt untersuchte. Er gelangte zum Ergebnisse, daß die Anwesenheit von Oxalsäure die Drehung des Invertzuckers nicht erhöht und in 1%iger Lösung mehrere Stunden bei 50 bis 53° C auf die Monosaccharide einwirkend diese nicht merklich angreift.

Es war mir von Interesse, den Einfluß steigender Oxalsäuremengen auf Lävulose in wässeriger Lösung kennen zu lernen.

Es wurde nachstehendes Resultat erzielt:

Lävulose + Oxalsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Oxalsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,063	5	— 90,50	— 90,62	+ 0,12
0,63	5	— 90,50	— 91,00	+ 0,50
1,575	5	— 90,50	— 91,54	+ 1,04

Es war also mit der Säurezunahme eine Steigerung der Rotation zu beobachten, die jedenfalls auch bei Invertzucker im Sinne einer Zunahme zum Ausdruck hätte kommen müssen. Wenn dies nicht der Fall war, so ist die Annahme zulässig, daß die Oxalsäure auch bei Glucose in wässeriger Lösung eine Zunahme der Rotation bewirkt, welche die Linksdrehung paralysiert. In der Tat zeigte sich bei Gegenwart von Oxalsäure eine deutliche Steigerung der Rotation von wässerigen Glucoselösungen.

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.
[4]) l. c.

Dextrose + Oxalsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Oxalsäure g	Dextrose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,63	5	52,80	52,91	+0,11
2,5	5	52,80	53,10	+0,30

Ost[1]) prüfte auch das Verhalten der Essigsäure und fand, entgegen den Angaben von Jungfleisch und Grimbert, in der Kälte eine Abnahme der Drehung des Invertzuckers, und zwar von —20,3 auf —19,77. Zur Aufklärung dieses Widerspruches prüfte ich auch den Einfluß von Essigsäure in wässeriger Lävuloselösung und erhielt nachstehende Werte:

Lävulose + Essigsäure.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Essigsäure g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
0,96	5	—90,50	—90,11	—0,39
4,80	5	—90,50	—90,21	—0,29
9,60	5	—90,50	—90,10	—0,40

Es findet somit bei Gegenwart von Essigsäure eine geringe Abnahme der Drehung statt. Die von Ost beobachtete stärkere Abnahme der Drehung des Invertzuckers bei Gegenwart von Essigsäure kann daher gleichfalls auf den Einfluß dieser Säure auf die gleichzeitig anwesende Glucose zurückgeführt werden, die nach den Versuchen von H. Trey[2]) schon bei einem Zusatz von 0,6% die spezifische Drehung der Glucose von + 50,67 auf + 51,83 erhöht.

Einfluß von Alkalien.

Nach Jodin[3]) bewirken alkalische Substanzen eine starke Verminderung der spezifischen Drehung der Lävulose; ebenso beobachteten Lobry de Bruyn und van Ekenstein[4]) schon bei Einwirkung geringer Mengen Alkali eine Abnahme der Rotation.

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 22, 424, 1897.

[3]) Compt. rend. 58, 613.

[4]) Recueil d. trav. chim. 15, 92; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1895, 3078.

Mit Rücksicht auf die besonders leichte chemische Einwirkung der Alkalien auf Lävulose kann angenommen werden, daß die Abnahme nicht allein auf physikalische, sondern vorwiegend auf chemische Ursachen zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, daß Alkalien schon in der Kälte eine starke Zersetzung und Umlagerung der Lävulose verursachen, wobei sich nach Peligot[1]), Kiliani[2]) u. a. Saccharin bildet. Nach van Ekenstein und Jorissen[3]) besitzt Saccharin eine spezifische Drehung

$$[\alpha]_D^{20} = +94{,}2.$$

Die wässerige Lösung des Saccharins wird bei längerem Stehen sauer, es bildet sich Saccharinsäure, die bei Gegenwart von Alkalien in schwach linksdrehende Saccharinate übergeht. Die Rotation der Lävulose wird somit bei Gegenwart von Alkalien in dem Maße zurückgehen müssen, je mehr Saccharinsäure sich bildet. In der Tat nimmt die Drehung mit der Zeit stark ab.

Lävulose + Natriumhydroxyd.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$ der Mischung		
Natriumhydroxyd g	Lävulose g	der reinen Lösung	nach 30 Min.	nach 24 Std.	nach 48 Std.
0,2003	5	— 91,12	— 86,80	— 61,22	— 40,85
10,00	5	— 91,12	— 47,52	—	—

Lävulose + Ammoniak.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$ der Mischung		
40%iges Ammoniak g	Lävulose g	der reinen Lösung	nach 30 Min.	nach 24 St.	nach 48 St.
5	5	—91,12	—83,00	—69,43	—56,22

Es nimmt somit das Drehungsvermögen dieser Lösungen mit fortschreitender Zersetzung ab. Die Lösungen färben sich allmählich gelb bis braun, bei Lauge schneller als bei Ammoniak. Schwache organische Basen, wie Pyridin, Hexamethylentetramin und Carbamid, waren ohne Einfluß oder bewirkten erst bei Zusätzen von über 10% eine minimale Herabsetzung der Rotation.

[1]) Compt. rend. 89, 918.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 15, 701.

[3]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 21, 383.

Einfluß von Salzen.

Rimbach und Weber[1]) untersuchten den Einfluß der alkalischen Erden auf die Rotation der Lävulose. Sie gelangten zum Ergebnisse, daß die Ketose eine viel größere Empfindlichkeit gegenüber den Chloriden der Erdalkalien zeigt als die Aldose. Ebenso bewirken die Verbindungen der entsprechenden Nebengruppen des periodischen Systems von Zink-, Kadmium- und Quecksilbersalzen bei der Lävulose größere Drehungsänderungen wie bei der Dextrose, während das Natriumtetraborat die Drehung beider Zuckerarten herabdrückt. Auch bei den Gliedern der 4. Gruppe des periodischen Systems, von denen Verbindungen des Thoriums, Ceriums, Zirkoniums und des Zinns untersucht wurden, zeigte die Lävulose eine bedeutend größere Empfindlichkeit im Vergleich zur Dextrose, und zwar im Sinne einer starken, mit der Menge des Salzes wachsenden Erhöhung, während die Zirkonsalze eine Verminderung bewirkten. Ein Herabdrücken der Rotation wurde ferner beobachtet bei Gegenwart von Ammoniumheptamolybdat, während Uranylnitrat um ein geringes steigert.

In Ergänzung dieser Beobachtungen wurden von mir noch einige Salze der Alkalien untersucht und hierbei nachstehende Beobachtungen gemacht.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Salz g	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
NaCl 10	5	−91,12	−92,86	+1,74
NaBr 10	5	−91,12	−95,52	+4,40
KJ 10	5	−91,12	−93,50	+2,42
KBr 10	5	−91,12	−95,12	+4,00

Einfluß von Alkoholen.

Jodin[2]) beobachtete bei Gegenwart von Äthylalkohol eine Depression der spezifischen Drehung der Lävulose, während Horsin-Deon[3]) keine Änderung fand, was nach Winters[4]) Angabe auf einem Irrtum beruht.

Genaue Versuche über den Einfluß der Gegenwart verschieden großer Mengen von Alkohol wurden bisher nicht ausgeführt. Einige orientierende Versuche zeigten, daß sich die Gegenwart von Alkohol in ganz bedeutendem Maße bemerkbar macht. Bei den folgenden Untersuchungen wurde gleichfalls die störende Multirotation ausgeschaltet und nur Zuckerlösungen

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 1905.
[2]) Compt. rend. 42, 901.
[3]) Journ. de fabr. de sucre 20, 37.
[4]) Annal. 244, 310.

von konstanter Drehung verwendet. Da ferner A. Milroy[1]) bei Gemischen von Glucoselösung mit Alkoholen eine allmähliche Änderung der Rotation mit der Zeit beobachtete, erschien es notwendig, auch bei der Lävulose diesen Einfluß zu berücksichtigen. Vergleichende Versuche führten zum Ergebnisse, daß hier die Konstanz der Drehung schon viel früher eintritt, wie bei der Glucose, und daß eine Änderung der Rotation mit der Zeit nur ganz wenig zu beobachten war, wie dies aus folgender Tabelle zu ersehen ist:

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Alkohol ccm	Lävulose g	nach 1 St.	nach 48 St.	
Methylalkohol 50	5	−78,81	−78,99	+0,18
Äthylalkohol 50	5	−76,40	−76,54	+0,14
Propylalkohol 50	5	−81,58	−81,60	+0,02

Um bei den folgenden Versuchen auch diesen geringen Einfluß auszuschalten, wurden die Mischungen in Kölbchen mit gut eingeriebenen Stöpseln mindestens 24 Stunden an einem dunklen, kühlen Orte stehen gelassen und dann polarisiert.

Lävulose + Methylalkohol.

Nach den Beobachtungen von Trey[2]) sowie von Milroy[3]) nimmt die Rotation der Glucose in wässeriger Lösung mit steigendem Gehalt an Methylalkohol zu. Die Lävulose zeigt das entgegengesetzte Verhalten; ihre Drehung nimmt mit wachsendem Alkoholgehalte ab, und zwar ist die Abnahme dem Gehalte an Methylalkohol proportional.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Methylalkohol ccm	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
10	5	−91,12	−88,76	−2,36
20	5	−91,12	−86,59	−4,53
30	5	−91,12	−84,19	−6,93
40	5	−91,12	−81,51	−10,61
50	5	−91,12	−78,99	−12,13

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 18, 193.
[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 18, 193; 22, 424.
[3]) l. c.

Die Drehung nimmt ziemlich regelmäßig ab, und läßt sich die Beziehung durch die Formel $\alpha_D = -(9{,}112 - 0{,}0238\ p)$ zum Ausdruck bringen.

Die aus dieser Formel berechneten Werte für α_D stimmen mit den gefundenen Drehungswinkeln gut überein.

Methylalkohol %	α_D gefunden	α_D berechnet	Differenz
10	− 8,876	− 8,874	+ 0,002
20	− 8,659	− 8,636	+ 0,023
30	− 8,419	− 8,398	+ 0,021
40	− 8,151	− 8,160	− 0,019
50	− 7,899	− 7,922	− 0,023

Lävulose + Äthylalkohol.

Auch bei Äthylalkohol fanden Deon, Winter, Trey sowie Milroy eine Erhöhung des Drehungsvermögens der Glucose, ungefähr proportional der Alkoholmenge.

Bei der Lävulose zeigte sich wieder eine regelmäßige Abnahme.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Äthylalkohol ccm	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
10	5	− 91,12	− 89,09	− 2,03
20	5	− 91,12	− 85,44	− 5,68
30	5	− 91,12	− 83,32	− 7,80
40	5	− 91,12	− 79,96	− 11,16
50	5	− 91,12	− 76,54	− 14,58

Die Beziehungen lassen sich hier innerhalb der untersuchten Prozentgehalte durch die Gleichung $\alpha_D = -(9{,}112 - 0{,}027\ p)$ ausdrücken.

Berechnet man mit Hilfe dieser Formel die Werte für α_D, so ergeben sich für die beobachteten und berechneten Drehungswinkel folgende Differenzen:

Äthylalkohol %	α_D gefunden	α_D berechnet	Differenz
10	− 8,859	− 8,842	+ 0,017
20	− 8,544	− 8,572	− 0,028
30	− 8,332	− 8,302	− 0,030
40	− 7,996	− 8,032	− 0,036
50	− 7,654	− 7,762	− 0,018

Im nachstehenden sind die Änderungen der spezifischen Drehungen für Glucose und Lävulose bei gleichem Prozentgehalte an Zucker und Alkohol vergleichsweise nebeneinander gestellt.

Dextrose.

100 ccm Lösung enthalten 5 g Dextrose und 50 ccm Alkohol.

Methylalkohol	Zunahme der Drehung	5,64
Äthylalkohol	„ „ „	4,83

Lävulose.

100 ccm Lösung enthalten 5 g Lävulose und 50 ccm Alkohol.

Methylalkohol	Abnahme der Drehung	12,13
Äthylalkohol	„ „ „	14,58

Wie aus diesen Zahlen zu ersehen ist, macht sich der Einfluß des Molekulargewichtes bei beiden Zuckerarten in verschiedener Weise geltend. Während bei der Glucose mit steigendem Molekulargewichte die Zunahme der Drehung geringer wird, bewirkt der gleiche Alkohol bei der Lävulose eine Vergrößerung der Depression.

Lävulose und Aceton.

Von besonderem Interesse war es, den Einfluß von Aceton auf die Rotation der Lävulose kennen zu lernen, weil mit diesem Körper schon früher eingehende Versuche mit Glukose ausgeführt wurden, die zu beachtenswerten Resultaten führten.

Přibram[1]) ermittelte für Glucose folgende Werte:

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Aceton ccm	Glucose	der reinen Lösung	der Mischung	
4	15,68	+ 52,89	+ 53,29	+ 0,4
8	15,68	+ 52,89	+ 53,63	+ 0,74
12	15,68	+ 52,89	+ 53,94	+ 1,05
16	15,68	+ 52,89	+ 54,23	+ 1,34
20	15,68	+ 52,89	+ 54,23	+ 1,64
24	15,68	+ 52,89	+ 54,81	+ 1,92
40	15,68	+ 52,89	+ 56,19	+ 3,30
50	15,68	+ 52,89	+ 57,03	+ 4,14

[1]) Sitzungsber. d Wien. Akad. 97, 670, 1888; Monatsh. 9, 401.

Die Zunahme der Rotation steigt regelmäßig mit dem Gehalte der Lösung an Aceton. Lävulose zeigt auch hier das entgegengesetzte Verhalten.

100 ccm Lösung enthalten		$[\alpha]_D^{20}$		Änderung der spezifischen Drehung
Aceton ccm	Lävulose g	der reinen Lösung	der Mischung	
5	5	−91,12	−89,22	− 1,90
10	5	−91,12	−87,44	− 3,68
15	5	−91,12	−85,56	− 5,56
20	5	−91,12	−83,79	− 7,33
25	5	−91,12	−81,96	− 9,16
30	5	−91,12	−79,82	−11,30
40	5	−91,12	−75,93	−15,19
50	5	−91,12	−72,20	−18,92

Die Abnahme der spezifischen Drehung ist bei Lävulose bedeutend größer als die Zunahme bei Glucoselösungen mit gleichem Gehalte an Aceton. Auch hier ist die Abnahme ziemlich regelmäßig und läßt sich durch die Formel $\alpha_D = -(9{,}112 - 0{,}0374\,p)$ ausdrücken.

Vergleicht man die beobachteten Drehungswinkel mit den berechneten, so ergeben sich nachstehende Differenzen:

Aceton	α_D gefunden	α_D berechnet	Differenz
5	−8,922	−8,925	−0,003
10	−8,744	−8,738	+0,006
15	−8,556	−8,551	+0,005
20	−8,379	−8,364	+0,015
25	−8,196	−8,187	+0,009
30	−7,982	−7,990	−0,008
40	−7,593	−7,616	+0,023
50	−7,220	−7,242	−0,022

In reinem Aceton ist die Lävulose entgegen den Angaben von E. Beckmann[1]) fast unlöslich. Von 5 g Lävulose, die mit 100 ccm Aceton bei Siedehitze behandelt wurden, gingen nur 0,2148 g in Lösung, die eine Drehung von $\alpha_D = -0{,}15$ zeigten.

Theoretisch ist das optische Verhalten der Lävulose in wässeriger Lösung bei Gegenwart von Alkoholen sowie von Aceton sehr interessant. Pribram[2]), der, wie oben erwähnt wurde, das Verhalten der Glucose bei Gegenwart von Alkoholen und von Aceton prüfte, fand eine Stei-

[1]) Zeitschr. f. anal. Chem. 1896, 35.

[2]) l. c.

gerung der Rotation, die mit dem Gehalte an Alkoholen oder Aceton regelmäßig zunahm. Er führt diese Steigerung darauf zurück, daß im umgekehrten Sinne wie bei der Birotation ein Zusammentreten der Einzelmoleküle des Zuckers zu größeren Molekülgruppen erfolgt, die ein höheres Drehungsvermögen besitzen. Diese Erklärung stützt sich auf eine schon früher von Dubrunfaut[1]), Erdmann[2]) und Béchamp[3]) aufgestellte Hypothese über die Birotation der Glucose, wonach diese Erscheinung damit zusammenhängt, daß dieser Zucker in zwei Modifikationen auftreten kann; einer krystallinischen und einer amorphen. Da die krystallinische Form höher dreht, so ist die Birotation darauf zurückzuführen, daß in der frischen Zuckerlösung anfänglich noch Molekülgruppen von aktivem Bau (Krystallmoleküle) sich befinden, die allmählich in die amorphe, schwächer drehende Form zerfallen. Weitere Versuche, die Pribram[4]) mit Weinsäure ausführte, haben jedoch ergeben, daß die Rotation dieser Säure durch Aceton erheblich vermindert wird. Pribram erklärt dies damit, daß die Weinsäure auch keine Birotation zeigt.

Die Lävulose besitzt aber bekanntlich die Eigenschaft der Multirotation. Nach Parkus und Tollens[5]) beträgt die Anfangsdrehung −104, die Enddrehung −92,3. Man sollte nun annehmen, daß auch bei dieser Zuckerart, die ebenso wie Glucose in reinem Aceton fast unlöslich ist, der Zusatz von Aceton eine Zunahme der Drehung bewirkt, wie dies bei der Glucose der Fall ist.

Die Versuche haben jedoch das Gegenteil ergeben. Die Rotation nimmt mit steigendem Acetongehalt erheblich ab. Die Hypothese Pribrams, wonach durch Zufügen von Aceton zur Zuckerlösung die Einzelmoleküle des Zuckers wieder zu größeren Gruppen von stärkerem Drehungsvermögen zusammentreten, kann demnach für die Lävulose nicht zutreffen. Hier wird man die Abnahme der Drehung auf eine durch das Lösungsmittel bewirkte Konfigurationsänderung innerhalb des Zuckermoleküls zurückführen müssen.

Das Ergebnis vorstehender Untersuchungen läßt sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Die meisten anorganischen Säuren bewirken eine Zunahme der spezifischen Drehung der Lävulose, die mit dem Gehalt an Säure steigt.

2. Von den untersuchten organischen Säuren bewirkt Oxalsäure eine Zunahme, während bei Gegenwart von Essigsäure eine schwache Abnahme erfolgt.

---

[1]) Compt rend. 42, 739.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 13, 2180.
[3]) Bull. soc. chim. 9, 511.
[4]) Sitzungsber. d. Wien. Akad. 97, II, 463.
[5]) L. Annal. 257, 166.

3. Alkalien bewirken eine mit der Zeit wachsende Depression der Drehung, die auf die tiefgreifende Umwandlung des Zuckers zurückzuführen ist. Schwach basische Körper sind auf die Rotation fast ohne Einfluß.

4. Anorganische Salze wirken auf die Drehung der Lävulose teils im Sinne einer Zunahme, teils im Sinne einer Abnahme. Auch hier macht sich der Einfluß der Konzentration geltend.

5. Alkohole verursachen im allgemeinen eine starke Verminderung der Drehung, die dem Gehalte an Alkohol proportional ist.

6. Aceton drückt die Rotation der Lävulose stark herab. Die Abnahme ist dem Gehalte an Aceton proportional und läßt sich durch eine einfache Beziehung zum Ausdruck bringen.

Versuche einer Isolierung des uricolytischen Fermentes.

Von

G. Galeotti.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der K. Universität Neapel.)

(*Eingegangen am 13. Dezember 1910.*)

Allgemein bekannt sind die Untersuchungen über das uricolytische Vermögen des Breies aus verschiedenen Organen, wie die Leber von Fleischfressern (Stokvis, Chassevant und Richet, Jacobi, Wiener, Loewi, Burian, Schittenhelm, Ascoli) und von Selachiern (Scaffidi), die Niere von Pflanzenfressern (Wiener), Muskeln, Magen und Darm von Fleischfressern (Burian) und Selachiern (Scaffidi).

Diese Untersuchungen ergaben übereinstimmende Resultate, und nur Austin bezweifelt, daß es sich um eine fermentative Zerstörung der Harnsäure handelt. Er sagt, die oben erwähnten Experimente seien nicht sehr zuverlässig, insofern als bei ihnen die Harnsäure stets in einer Lösung von Natriumhydrat gelöst war und auch die schwächsten Alkalien die Harnsäure bei Körpertemperatur zerstören können. Auf diesen Einwand läßt sich jedoch erwidern, daß in Extrakten aus Organen nach dem Kochen die Harnsäurezersetzung zum Stillstand kommt, obgleich diese Extrakte wie die aktiv bleibenden behandelt wurden.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die uricolytischen Enzyme zu isolieren, und in dieser Hinsicht halte ich es für angezeigt, die folgenden kurzen Angaben anzuführen.

Wiener fällte die Extrakte aus Organen (Rinderniere) durch Essigsäure oder Methylalkohol und Ammoniumsulfat und unterzog dann das Präcipitat der Pepsin- oder Trypsinverdauung, nach der er wieder durch Methylalkohol fällte und mit einer Natriumcarbonatlösung extrahierte.

Schittenhelm verwendete die Methode Rosells (Fällung durch Uranilacetat in alkalischem Medium) und erhielt ein sehr aktives Ferment.

Wiechowsky und Wiener behaupten, daß das uricolytische Ferment im Innern der Zellen enthalten sei, und daß man diese zerstören müsse, um es zu erhalten. Deshalb trocknen sie die Organe und zerreiben sie, bis sie in feines Pulver verwandelt sind, das mit Toluol behandelt wird. Die Extrakte aus diesem Pulver enthalten das Ferment.

Croftan behandelte den Brei aus Organen mit 95° Alkohol; die so erhaltene Masse wurde nach wiederholtem Auswaschen, Austrocknen und Zerreiben mit normaler Kochsalzlösung extrahiert. Die filtrierte Flüssigkeit enthielt ein Ferment, das jedoch nach den Zahlen dieses Autors sehr wenig aktiv zu sein scheint.

Es schien mir deshalb der Mühe wert zu sein, diesen Weg weiter zu verfolgen und eine Methode zu suchen, mittels der das uricolytische Ferment im Zustand relativer Reinheit und so isoliert werden konnte, daß es zu einem umfangreicheren und sichereren Studium der Uricolyse dienen kann. Auf den folgenden Seiten sind die bisher erhaltenen Resultate angeführt.

Methode.

Ich habe mit Lebern von Hunden und den Arten Scyllium und Mustelus angehörenden Selachiern experimentiert.

Die zu jedem Versuch dienende Harnsäure wurde in $^n/_{10}$-Sodalösung (mit aus Natrium bereiteter Soda hergestellt) gelöst. Zuerst wurde die Harnsäure gewogen; dann wurden ihr so viel Kubikzentimeter Sodalösung zugesetzt, als gerade genügten, um sie in Urat umzuwandeln. Die Lösung wurde dann in zwei oder mehr Teile geteilt und ein jeder dieser Teile mit der Flüssigkeit vermischt, die das Ferment enthalten sollte.

Den verschiedenen Probeflüssigkeiten wurde dann Chloroform zugesetzt, und sie wurden in geeignete Flaschen gebracht, durch die fortwährend Sauerstoff geleitet wurde. Die Flaschen wurden dann in einen Thermostaten mit einer Temperatur von 39° gebracht und blieben 24 bis 36 Stunden darin. Die zur Kontrolle dienenden Flüssigkeiten kochte ich sofort nach der Mischung mit der Harnsäurelösung.

Bei den quantitativen Bestimmungen der Harnsäure benutzte ich die von Scaffidi modifizierte Silbermethode; später verwendete ich jedoch eine viel einfachere Methode.

Die erstere Methode besteht in folgendem: Nach dem Kochen der die Harnsäure enthaltenden Fermentlösung, wird diese warm filtriert, der geringe Rückstand wird genau gewaschen und das Filtrat durch Verdunsten auf ein Volum von 150 bis

200 ccm gebracht. Man setzt etwas Magnesiummischung, reichlich Ammoniak und ammoniakalische Silberlösung hinzu und läßt die Mischung 24 Stunden lang ruhig im Dunkeln stehen. Dann bringt man das Präcipitat auf ein Filter, wäscht sorgfältig mit kaltem und warmem Wasser und bringt das Filter in einen ca. 400 ccm Wasser enthaltenden Kolben. Man säuert mit $^1/_2$ ccm Essigsäure an und setzt, während das Wasser kocht, eine genügende Menge Schwefelnatriumlösung hinzu; dann kocht man nochmals mehrere Stunden lang, bis das Schwefelsilber sich deutlich abscheidet, indem es eine vollkommen klare und farblose Flüssigkeit zurückläßt. Man filtriert rasch in der Wärme und läßt das Filtrat, dem man 1 ccm Salzsäure hinzusetzt, in einem Glasgefäß bis zu einem Rückstand von 10 ccm verdunsten. Man stellt dann das Gefäß 24 Stunden lang in die Kälte; auf diese Weise fällt die ganze Harnsäure aus. Diese sammelt man auf einem gewogenen Filter, wäscht mit kaltem Wasser und bringt dann die Harnsäure in ein Glasgefäß vermittels eines gegen das Filter gerichteten Wasserstrahls, der in den über das Gefäß halb umgekehrten Trichter geleitet wird. Auf diese Weise gelangt die ganze Harnsäure in das Gefäß, indem sie in dem Waschwasser suspendiert bleibt. Das Filter muß ganz und unversehrt bleiben, da es noch zu einer zweiten Filtration dienen muß. Nun dampft man bis zu vollständiger Trockenheit ein und gießt dann in das Gefäß 4 ccm konzentrierte Schwefelsäure (Horbaczewskysches Verfahren); während das Gefäß mit Eis gekühlt wird und nachdem die Harnsäure ganz gelöst ist, setzt man allmählich 40 ccm schon erkaltetes Wasser hinzu. Die Harnsäure fällt quantitativ aus und wird nach 24 Stunden auf demselben Filter gesammelt, das zur Trennung der Harnsäure von der Salzsäurelösung gedient hat. Hierauf wäscht man, trocknet das Filter bei 100° und wiegt.

Diese Methode, die im allgemeinen gute Dienste leistet, erfüllt ihren Zweck nicht mehr in befriedigender Weise, wenn die Harnsäure mit verschiedenen Eiweißderivaten und namentlich mit Albumosen vermischt ist. Alsdann hat die Hauptoperation, die Fällung des Silbers, keinen Wert mehr, weil diese Eiweißderivate ebenfalls zugleich mit der Harnsäure niederschlägt und man nach der Dissoziation mit dem Natriumsulfhydrat wieder wie zuerst eine von Schlacken erfüllte Flüssigkeit hat.

Ferner verhindern diese Schlacken sehr oft die Fällung des Schwefelsilbers, das sich im kolloidalen Zustand bildet und nicht mehr präcipitiert, weder nach langem Kochen noch nach Ansäuern mit Essigsäure.

Ich habe mich auf diese Weise von der Nutzlosigkeit der Silberfällung bei Gegenwart von Albumosen in der Flüssigkeit überzeugt und kam deshalb auf den Gedanken, sie bei den von mir an Extrakten der Acetonniederschläge gemachten Bestimmungen ganz beiseite zu lassen. Deshalb habe ich die Methode folgendermaßen vereinfacht:

Das sofort nach Unterbrechung der Fermenteinwirkung durch das Kochen erhaltene Filtrat, das stets eine klare und wenig gefärbte Flüssigkeit war, wurde mit 2 ccm HCl angesäuert und zum Verdunsten bis auf 20 ccm in ein kleines Gefäß gebracht. Die Lösung blieb ganz klar, und es bildeten sich allmählich schöne Harnsäurekrystalle darin, die nach 24 Stunden durch Filtration abgeschieden und dem Horbaczewskyschen Verfahren unterzogen wurden, wie ich es schon oben erwähnte. Diese Einfachheit der analytischen Methode war dadurch gerechtfertigt, daß in den von mir verwendeten Flüssigkeiten die Salzsäure kleine Mengen aller anderen organischen Substanzen in Lösung hält und nur die Harnsäure in Gestalt von Krystallen präcipitieren läßt. Diese werden dann mittels konzentrierter Schwefelsäure gereinigt.

Zuerst machte ich ein Experiment zur Probe, um mich davon zu vergewissern, daß diese Methode den Anforderungen genügt; das Resultat war das folgende:

Eine Harnsäurelösung in $^n/_{10}$-Soda wurde in zwei vollkommen gleiche Hälften geteilt; einem Teil setzte ich ohne weiteres HCl hinzu, bis diese Säure sich darin im Verhältnis von 10 % befand; dann ließ ich das Ganze 24 Stunden lang in Ruhe, sammelte die Harnsäurekrystalle auf tariertem Filter, wusch, trocknete und wog.

Der andere Teil wurde mit dem Extrakt des Acetonniederschlages vereinigt, der wie bei den Experimenten 5 bis 9 gewonnen und schon gekocht war (200 ccm). Ich setzte 2 ccm HCl hinzu und ließ bis auf ca. 20 ccm verdunsten. Nach 24 Stunden sammelte ich die Harnsäurekrystalle und schritt zur Horbaczewskyschen Behandlung.

Es ergaben sich:

Aus dem ersten Teil (Kontrolle) . 0,1250 g Harnsäure,

„ „ zweiten „ . . . . . 0,1270 g „

Der Unterschied beträgt also 2 mg, d. h. er bewegt sich in den Fehlergrenzen, die bei quantitativen Bestimmungen der Harnsäure gewöhnlich gemacht werden.

Ich beginne nunmehr mit der Beschreibung meiner Experimente.

1. Experiment.

Hundeleber.

Eine Hundeleber wird mit Sand zerrieben und dem Gewichte nach ebensoviel Ringersche Flüssigkeit zugesetzt. Nach 24 Stunden wird filtriert. Die klare Flüssigkeit wird in 3 Teile, jeder von 250 ccm, geteilt.

Teil A (Kontrolle). Ich setze 0,216 g Harnsäure[1]) hinzu und bringe die Mischung sofort zum Sieden.

Ich erhalte wieder 0,210 g Harnsäure.

Teil B. Dem Extrakt werden 0,216 g Harnsäure zugesetzt. Es bleibt 2 Tage im Brutschrank bei 39° mit Sauerstoffstrom.

Ich erhalte 0,0227 g Harnsäure wieder.

Folglich sind 0,1933 g Harnsäure, d. h. 89,4% zerstört worden.

Teil C. 250 ccm Extrakt werden mit Essigsäure angesäuert. Hierauf wird filtriert. Nachdem das Filtrat neutralisiert ist, werden ihm 0,216 g Harnsäure zugesetzt. Nach 2tägigem Verweilen im Brutschrank bei 39° im Sauerstoffstrom erhalte ich 0,1322 g wieder.

Folglich sind 0,0838 g Harnsäure oder 38,8% zerstört worden.

Teil D. Das nach der Ansäuerung des Teiles C erhaltene Präcipitat wird in Wasser suspendiert und leicht alkalinisiert. Hierauf setze ich 0,216 g Harnsäure hinzu. Nach 2tägigem Verweilen im Brutschrank bei 39° im Sauerstoffstrom erhalte ich 0,986 g Harnsäure wieder.

Also sind 0,1174 g Harnsäure oder 54,4% zerstört worden.

2. Experiment.

Leber von Scyllium.

Die Leber wird in einem Porzellanmörser zerstampft; darauf wird mit Toluol gesättigte Ringersche Flüssigkeit zugesetzt. Nach 8 Tagen wird filtriert; die Flüssigkeit wird angesäuert und mit ebensoviel gesättigter $CaCl_2$-Lösung vermischt. Es bildet sich ein Präcipitat, das auf einem Filter gesammelt wird.

A. Das Filtrat wird 24 Stunden lang dialysiert; es werden ihm 0,15 g Harnsäure zugesetzt, dann bleibt es 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom. Zuletzt erhalte ich 0,1123 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0467 g, also 28,7%.

B. Das Präcipitat wird ebenfalls 24 Stunden lang dialysiert. Der im Dialysator enthaltenen Flüssigkeit werden 0,0987 g Harnsäure zu-

[1]) Bei diesem und bei allen folgenden Experimenten wurde die Harnsäure in $^2/_{10}$-Sodalösung aufgelöst, wie schon S. 375 bemerkt wurde.

gesetzt; dann bleibt sie 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank mit Sauerstoffstrom.

Ich erhalte zuletzt 0,0825 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0162 g, d. h. 16,4%.

3. Experiment.

Leber von Scyllium.

Die Leber wird in einem Porzellanmörser zerstampft und mit Toluol versetzte Ringersche Flüssigkeit zugesetzt. Nach 8 Tagen wird filtriert. Dem Filtrat wird ein gleiches Volum Aceton zugesetzt. Das Präcipitat wird auf einem Filter gesammelt; ich lasse das Aceton verdunsten und extrahiere das Präcipitat mit Wasser, das ein wenig NaCl enthält. Der klaren Flüssigkeit setze ich die Harnsäurelösung zu und teile sie dann in 2 Teile.

Teil A (Kontrolle) wird gleich gekocht.

Ich erhalte daraus 0,0707 g Harnsäure.

Teil B bleibt bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom 36 Stunden lang.

Zuletzt erhalte ich daraus 0,0652 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure (in Vergleich mit A) 0,0075 g oder 11,9%.

4. Experiment.

Leber von Scyllium.

Die Leber wird in einem Porzellanmörser zerstampft. Ich setze ihr ein gleiches Volum Glycerin und wenige Tropfen Chloroform zu. Nach 8 Tagen verdünne ich mit H_2O und filtriere. Das Filtrat wird durch Aceton gefällt; das Präcipitat wird mit NaCl-Lösung extrahiert. Der klaren Flüssigkeit werden 0,222 g Harnsäure zugesetzt; dann wird sie in 2 gleiche Teile geteilt.

Teil A (Kontrolle) wird sofort gekocht.

Ich erhalte daraus 0,1035 g Harnsäure.

Teil B bleibt 36 Stunden lang im Brutschrank im Sauerstoffstrom bei 38°.

Zuletzt erhalte ich daraus 0,0598 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0437 g oder 39,4%.

5. Experiment.

Leber von Scyllium.

Die Leber wird mit Quarzsand in einem Porzellanmörser zerrieben. Die Masse wird bei 300 Atmosphärendruck gepreßt. Die Flüssigkeit wird mit gesättigtem Toluolwasser verdünnt. Ich filtriere und fälle durch Aceton; das Präcipitat wird mit NaCl-Lösung extrahiert. Dem klaren Filtrat wird Harnsäure zugesetzt; das Ganze wird in 2 gleiche Teile geteilt.

Teil A (Kontrolle) wird sofort gekocht.

Ich erhalte daraus 0,0929 g Harnsäure.

Teil B bleibt 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom.

Ich erhalte daraus 0,0695 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure (in Vergleich mit A) 0,0234 g oder 25,2%.

6. Experiment.

Leber von Mustelus.

Die Leber ist sehr reich an Fett. Sie wird fein zerrieben, Toluolwasser hinzugesetzt, und nach 24 Stunden wird dieses wässerige Extrakt von der großen Menge flüssigen Fettes, die sich gebildet hat, getrennt. Ich filtriere und fälle mit Aceton.

Das Präcipitat wird wie gewöhnlich mit NaCl-Lösung behandelt. Nachdem der Flüssigkeit 0,234 g Harnsäure zugesetzt worden sind, wird sie in 2 gleiche Teile geteilt.

Teil A (Kontrolle) wird sogleich gekocht. Ich erhalte daraus 0,1036 g Harnsäure.

Teil B bleibt 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom.

Zuletzt erhalte ich daraus 0,0453 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure (in Vergleich mit A) 0,0717 g oder 61,3%.

7. Experiment.

Leber von Mustelus.

Die Leber wird fein mit Quarzsand zerrieben, bei 300 Atmosphären gepreßt; hierauf wird Wasser zugesetzt. Das Fett wird entfernt, das wässerige Extrakt filtriert und das Filtrat mit einem gleichen Volum Aceton behandelt. Das Präcipitat (A) wird gesammelt und wie gewöhnlich mit NaCl-Lösung extrahiert. Der durch das Filter passierten Mischung von Wasser und Aceton wird noch ein gleiches Volum Aceton zugesetzt. Es bildet sich ein weiteres Präcipitat (B), das ebenfalls gesammelt wird.

Präcipitat A. Es wird wie gewöhnlich mit NaCl-Lösung extrahiert. Der durch Filtration abgetrennten Flüssigkeit werden 0,1196 g Harnsäure zugesetzt; sie bleibt 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom.

Zuletzt erhalte ich 0,0352 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0844 g oder 70,9%.

Präcipitat B. Es wird ebenfalls mit NaCl-Lösung extrahiert. Der durch Filtration abgetrennten Flüssigkeit werden 0,1162 g Harnsäure zugesetzt; sie bleibt 36 Stunden lang bei 39° im Brutschrank im Sauerstoffstrom.

Zuletzt erhalte ich 0,0699 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0463 g oder 39,9%.

8. Experiment.

Leber von Mustelus.

Die Leber wird fein zerrieben. Ich setze ihr Glycerin und Chloroform und nach 10 Tagen Wasser hinzu. Das Filtrat wird durch Aceton gefällt und der Niederschlag mit NaCl-Lösung extrahiert.

Dem Filtrat werden 0,150 g Harnsäure zugesetzt. Nach 36 Stunden bei 39° im Sauerstoffstrom erhalte ich 0,1048 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0452 g oder 30,1%.

9. Experiment.

Leber von Mustelus.

Ich mache daraus ein wässeriges Extrakt. Die Flüssigkeit wird mit Aceton behandelt, das Präcipitat mit NaCl-Lösung extrahiert. Dem Filtrat werden 0,129 g Harnsäure zugesetzt.

Nach 36 Stunden bei 39° im Sauerstoffstrom erhalte ich zuletzt 0,0773 g Harnsäure.

Menge der zerstörten Harnsäure 0,0517 g oder 40,2%.

Zusammenfassende Tabelle.

Nr. des Experimentes	Organ, aus dem das Ferment extrahiert wurde	Verfahren bei Extrahierung des Ferments	Menge der zerstörten Harnsäure %
1	Hundeleber	Extrahierung mit Ringerscher Flüssigkeit: B. Ganzes Extrakt	89,4
		C. Filtrat nach der Ansäuerung	54,4
		D. Mit Essigsäure erhaltenes Präcipitat	38,8
2	Leber von Scyllium	Extrahierung mit Ringerscher Flüssigkeit: A. Filtrat	28,7
		Fällung mit $CaCl_2$ nach Ansäuerung: B. Präcipitat	16,4
3	Leber von Scyllium	Extrahierg. mit Ringerscher Flüssigkeit, Fällung durch Aceton	11,9
4	Leber von Scyllium	Extrahierung mit Glycerin, Verdünnung mit H_2O, Fällung durch Aceton	39,4
5	Leber von Scyllium	Zerreibung mit Quarzsand, Kompression bei 300 Atmosphären, Verdünnung des Saftes mit H_2O, Fällung durch Aceton	25,2
6	Leber von Mustelus	Extrahierung mit Wasser, Fällung durch Aceton	61,3
7	Leber von Mustelus	Zerreibung mit Sand, Kompression bei 300 Atmosphären: Präcipitat A.	70,9
		Verdünnung mit H_2O, Fällung durch Aceton: Präcipitat B.	39,9
8	Leber von Mustelus	Extrahierung mit Glycerin, Verdünnung mit Wasser, Fällung durch Aceton	30,1
9	Leber von Mustelus	Extrahierung mit Wasser, Fällung durch Aceton	40,2

Schlußfolgerungen.

Aus diesen und aus anderen Experimenten, die ich der Kürze halber nicht beschreibe, ergibt sich, daß eine relative Isolierung des uricolytischen Fermentes aus den Leberextrakten des Hundes und der Selachier (von der Gattung Scyllium und Mustelus) möglich ist.

Unter den verwendeten Methoden ist die beste vielleicht die der Fällung durch Aceton, da auf diese Weise eine Trennung des Fermentes von einer größeren Menge Schlacken erreicht wird, obschon keineswegs anzunehmen ist, daß man das Ferment wirklich isoliert.

Aus den Zahlen der letzten Tabelle ersieht man, daß das mittels derselben Methode der Fällung durch Aceton erhaltene Ferment sich bald sehr aktiv zeigt (Zerstörung von 70% der Harnsäure — 7. Experiment, B) bald spärliche Aktivität besitzt. Zerstörung von 11,9% der Harnsäure — 3. Experiment. Dies hängt vielleicht ab nicht nur von der Menge des Acetons, das im Verhältnis zur Menge der im Extrakt enthaltenen Eiweißstoffe verwendet wurde, sondern auch von der Zeit, während der das Aceton eingewirkt hat, da es gewiß ist, daß dieser Stoff nicht unschädlich ist und zuletzt eine schädliche Wirkung auf dieses wie auf andere Fermente ausübt. In der Tat ersieht man aus dem 6. Experiment, daß, während die erste Fällung ein sehr aktives Ferment ergab, bei der zweiten die Aktivität des Fermentes ungefähr um die Hälfte abnahm.

Zum Schluß glaube ich die Methode, die mir zur relativen Isolierung des uricolytischen Fermentes als die beste erscheint, folgendermaßen formulieren zu können:

1. Man zerreibe das Organ mit Quarzsand, um soweit als möglich die Zerstörung der Zellelemente herbeizuführen.

2. Man presse die Masse bei hohem Drucke aus.

3. Man setze dem erhaltenen Saft Wasser hinzu und entferne das Fett.

4. Man fälle, indem man der Flüssigkeit ein gleiches Volum Aceton zusetzt.

5. Man filtriere rasch und lasse das Aceton einige Minuten lang aus dem Präcipitat verdunsten, indem man dieses auf einem Bogen Filtrierpapier ausbreitet; man sorge dafür, daß

das Präcipität so geringe Zeit als möglich mit dem Aceton in Berührung bleibt.

6. Man extrahiere das Präcipitat mit NaCl-Lösung. In der filtrierten Flüssigkeit befindet sich dann das Ferment.

Literatur.

Stokvis, Arch. f. d. Holland. Beiträge. 2.
Chasserant und Richet, Compt. rend. Biol. 1897.
Jacobi, Virchows Archiv 57.
Wiener, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42.
Loewi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25.
Burian, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.
Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43 und 45.
Scaffidi, diese Zeitschr. 18 und 25.
Wiener, Centralbl. f. Physiol. 18.
Austin, The journal of med. research. 15 und 16.
Wiechowski und Wiener, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9.
Croftan, Pflügers Archiv 121.

Beiträge zur Kenntnis der Milchkatalase.

Von

Franz Spindler.

(Aus dem milchhygienischen Institute der Tierärztlichen Hochschule in Wien.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

Katalase läßt sich mit den bisher bekannten Hilfsmitteln und Untersuchungsmethoden nicht direkt nachweisen und daher auch hinsichtlich ihrer Menge nicht bestimmen, sondern man kann auf ihre Quantität nur einerseits aus der Menge des bei der Reaktion zersetzten, beziehungsweise nicht zersetzten Wasserstoffsuperoxydes, andrerseits aus dem Quantum des durch die Zersetzung aus H_2O_2 entwickelten Sauerstoffs schließen.

Die erste Methode ist eine maßanalytische Bestimmung des bei der Reaktion nicht zersetzten Wasserstoffsuperoxydes mit Hilfe einer 10%igen Jodkalilösung (jodometrische Methode); dieselbe wurde von Armand Bertrand[1]) eingehend beschrieben, von Jolles[1]) und Koning[1]) modifiziert; danach wird das nicht verbrauchte, also überschüssige Wasserstoffsuperoxyd berechnet und aus der Differenz desselben und der angewendeten Peroxydmenge die vorhandene Katalase bestimmt. Für die Praxis indessen ist diese Bestimmungsart verwickelt und langwierig[1]). Viel schneller und viel bequemer erhalten wir Aufschluß über die Quantität der Katalase der Milch, wenn wir die zweite, die sogenannte volumetrische oder eudiometrische Methode, die den abgespaltenen Sauerstoff bestimmt, verwenden. Hierzu wurden von den verschiedenen Forschern teils Gärröhrchen

[Koning[1])], teils eigens hierzu konstruierte Apparate benützt, so von Hecht und Friedjung[2]) (klinisches Katalyseometer), von Prof. Dr. Koeppe[3]), von Dr. Koestler[4]), Liebermann[5]) (Manometer), von Vandevelde[6]) der Schüttelapparat von Warton.

Ich habe für meine Katalaseversuche die von Dr. Lobeck konstruierten, von der Firma Hugershoff in Leipzig vor mehreren Monaten eingeführten „Katalaser" gebraucht.

Über die Beschaffenheit und Handhabung dieses Apparates möchte ich unter teilweiser Benützung des Prospektes obiger Firma folgendes bemerken.

Dr. Lobecks Katalase-Gläschen.

Der Apparat besteht aus dem zur Aufnahme der Milch und der Wasserstoffsuperoxydlösung dienenden zylindrischen Gefäße *A*, das am unteren Ende *b* halsartig eingezogen ist und mit einem Zapfen verschlossen wird. Am oberen Ende ist seitlich ein mit Gewinde versehenes kurzes Glasrohr *c* angeschmolzen, das mit Metallschraubverschluß abgedichtet werden kann. Das obere Ende *d* des Meßrohres *B* ist in gleicher Weise verschließbar. Der Meßraum steht mit dem Gasentwickelungsbehälter durch ein dünnes, bis nahe zur Spitze des ersteren führendes Rohr *e* in Verbindung. In das obere Ende der Meßröhre ist ein bis nahe zu ihrem Boden führendes Rohr *f* eingeschmolzen, das nach außen hin halbkreisförmig abgebogen ist.

In meinen weiteren Ausführungen will ich das Gefäß *A* als „Milchbehälter", *B* als „Wasserbehälter", das Rohr *e* als „Gasrohr", *f* als „Wasserrohr", das Glasrohr *c* als „unteren", *d* als „oberen Tubus" bezeichnen.

Hinsichtlich der Anwendung des Apparates möchte ich auf folgende, bei der Beschickung nicht unwesentliche Momente aufmerksam machen. Ich fülle zuerst den Wasserbehälter mittels einer Spritzflasche — denn diese gestattet bei Massenanalysen ein rascheres Anfüllen der Katalaser als Pipette oder Trichterchen — mit warmem Wasser von 37° C; das-

---

[1]) C. J. Koning, Biolog. u. biochem. Studien über Milch. Leipzig 1906 u. 1908.

[2]) Hecht und Friedjung, Arch. f. Kinderheilk. 37, 177, 1903.

[3]) Koeppe, Monatsschr. f. Kinderheilk., 1907, 661. — Schellhase, Inaug.-Diss., Gießen.

[4]) Dr. G. Koestler, Milchwirtschaftliches Centralblatt 1908, 532, IV. Jahrg.

[5]) Leo Liebermann, zitiert n. Malys Jahresber. üb. Tierchemie, XXXIV, Ref. 677.

[6]) R. Vandevelde, zltiert n. Malys Jahresber. üb. Tierchemie, XXXVII, Ref. 263.

selbe stellt sich von selbst durch Abfließen der etwa überschüssigen Flüssigkeit durch das Gasrohr auf den Nullpunkt ein. Dann verschließe ich den Halsteil *b*, fülle 15 ccm Milch in den Milchbehälter, bringe dann erst den Verschluß am oberen Tubus an, da bei geschlossenem oberem Tubus die Milch beim Einfüllen leicht bei *c* überfließt, und stelle die Katalaser, jedoch nur bis zu dem noch offenen unteren Tubus, damit kein Wasser durch denselben in den Milchbehälter eindringt, durch zirka

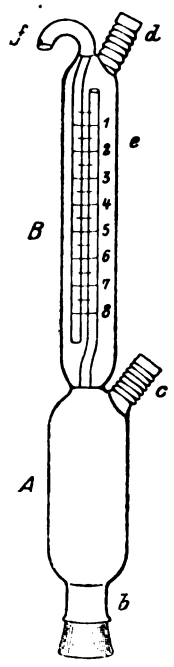


Fig. 1.

$^1/_4$ Stunde in das Wasserbad von 37° C behufs Erwärmung der Gläschen sowie der Milch und der darüber befindlichen Luft. Dadurch will ich einerseits das Austreiben der in der Milch enthaltenen Gase, soweit dies bei der angewendeten Temperatur von 37° C möglich ist, bewirken, andrerseits der nachträglichen Ausdehnung der über der Milch befindlichen Luft und hierdurch bedingten fehlerhaften Resultaten vorbeugen; denn ich habe die Wahrnehmung gemacht, daß, wenn ich 15 ccm normale süße Milch von niedriger Temperatur, und zwar 7° bis 13° C, ungewärmt ohne Zusatz von H_2O_2 bei geschlossenem Milchbehälter in das Wasserbad von 37° C brachte, eine Gasentwicklung von 1,2 bis 2,5 ccm erfolgte, während bei dem mit Milch von Zimmertemperatur vollgefüllten Behälter der kleinen Katalaser, also von ca. 22 ccm Inhalt, keine, in einem Falle von Mastitis 0,3 ccm, bei den großen Katalasern (siehe später) mit einem Inhalt von ca. 45 ccm Milch höchstens 0,5 ccm Gas sich entwickelten. Nur saure Mastitismilch lieferte 1,5 ccm, bei vorheriger Erwärmung der Milch 1,0 ccm Gas. Es spielt also weniger der Gasgehalt der Milch als die Menge der über der Milch sich befindlichen Luft hierbei eine Rolle. Behufs Feststellung dieser Tatsache stellte ich einen leeren, verschlossenen Katalaser in das Wasserbad, wodurch nach einer Stunde 2,4 ccm Wasser verdrängt wurden, und wenn ich die Gasentwicklung von kalter (8 bis 10° C) und von vorher ca. $^1/_4$ Stunde gewärmter Milch, beide gleichzeitig und unter gleichen Verhältnissen mit H_2O_2 beschickt, in der nachfolgenden Tabelle vergleiche, so ist fast regelmäßig bei der kalten eine um 0,5 bis 2,4 ccm höhere Zahl als bei der gewärmten zu konstatieren; nur Colostralmilch und Milch von einer güsten und einer peritonitiskranken Kuh, also eine stark katalasehaltige Milch ergab das umgekehrte Resultat, was vielleicht auf ein durch die vorhergehende Erwärmung bedingtes Freiwerden von gebundener Katalase, bzw. auf die raschere Entwicklung der die Katalase bedingenden Faktoren zurückzuführen ist. — Nach ca. $^1/_4$stündigem Vorwärmen der Milch und der Katalaser werden 5 ccm 1% H_2O_2 zugesetzt und in

der ersten Stunde $^1/_4$ständig, dann in Zwischenräumen von je einer Stunde abgelesen. Dies habe ich bei 25° Wasserbadtemperatur bis nach Ablauf von 8 und oft noch mehr Stunden, bei 37° bis zu 4 Stunden fortgesetzt, obwohl ich bei 37° meistenteils schon nach 2 Stunden, bei 25° schon nach 4 Stunden das Maximum der Gasentwicklung fand; nach dieser Zeit betrug die Steigerung höchstens mehr einige Zehntel.

Einfluß der Milchtemperatur.

		Sauerstoff in Kubikzentimetern bei gewärmt. Milch	gekühlter Milch	Differenz	Anmerkung
1	Kuhcolostr., sauer	7,9	10,3	2,4	7°
2	„ „	4,6	5,2	0,6	7°
3	„ „	0,8	2,1	1,3	9°
4	„ „	20,0	21,0	1,0	—
5	Kuhmilch, Mastit.	20,5	21,0	0,5	—
6	„ „	19,0	21,0	2,0	—
7	„ „	14,8	16,7	1,9	13°
8	„ „	4,6	6,8	2,2	8°
9	„ „	4,8	7,0	2,2	8°
10	„ „	5,3	6,5	1,2	—
11	„ abgel. Mast.	13,0	14,5	1,5	—
12	„ „	13,0	12,0	— 1,0	negative Differenz
13	„ Peritonit.	18,0	16,5	— 1,5	do.

Bei katalasereicher Milch wickelte sich die Reaktion in der Hauptsache in der ersten und zweiten Viertelstunde ab; nach einer Stunde war eine Zunahme höchst selten und wenn, so nur um ganz minimale Größen (Zehntel) wahrnehmbar: Ein abnorm hoher Katalasegehalt läßt sich schon innerhalb der ersten Minuten feststellen, weil die Reaktionsgeschwindigkeit in einem solchen Falle eine sehr bedeutende ist. Als Temperatur des Wasserbades habe ich bei den ersten Versuchen eine solche von 25° C, später aber nach Koning[1]) und Seligmann[2]) die von diesen als Optimaltemperatur der Katalase bezeichnete von + 37° C angewendet, die eine stärkere und raschere katalytische Wirkung entfaltet und einen günstigeren Einfluß auf den Reaktionsvorgang auszuüben scheint als die niedere von 25° C. Dies geht aus der folgenden Tabelle über verschiedene Wasserbadtemperatur hervor. Ich habe 8 Proben zuerst bei 25° C durch 8 Stunden aufgestellt und, nachdem in der letzten Stunde eine weitere Zunahme der Gasmenge nicht mehr eintrat, dieselben in ein Wasserbad von 37° gegeben, in dem sämtliche Proben innerhalb $^1/_4$ Stunde eine um 0,6 bis 1,4 ccm, nach weiteren 3 Stunden eine um weitere 0,0 bis 1,3 höhere

[1]) Biolog. u. biochem. Studien über Milch. Leipzig 1906 u. 1908.
[2]) Sommerfeld, Handb. d. Milchkunde, 1909.

Katalasezahl zeigten. Eine Ausdehnung der über der Milch befindlichen Luft durch die höhere Wärme dürfte kaum hier in Frage kommen, da sonst bei allen 8 Katalasern eine mehr gleichmäßige Erhöhung der Sauerstoffmenge aufgetreten sein müßte. Bezüglich der Eignung des Dr. Lobeckschen Katalasers für die Katalaseuntersuchung möchte ich meiner Ansicht dahin Ausdruck geben, daß derselbe im allgemeinen im Prinzipe sehr gut ist und einen tadellos funktionierenden Apparat darstellt, der durch seine einfache, leichte und bequeme Handhabung und Beschickung, durch sein kompendiöses Volumen und die dadurch bedingte Raumersparnis den übrigen bisher konstruierten Apparaten dieser Art, die sämtlich infolge ihrer kombinierten Zusammensetzung die Verwendung mehr oder weniger umständlich und zeitraubend gestalten, gewiß nicht nach steht, sie eher übertrifft, und bis zur möglichen Fassungsmenge jeglichen Gasverlust ausschließt; aus diesen Gründen eignet er sich besonders zur praktischen Massenanalyse und spielen hierbei derartige minimale Differenzen, wie sie bei Außerachtlassung der von mir geübten Untersuchungsmethode entstehen, deshalb, weil sie konstant auftreten, keine Rolle.

Verschiedene Wasserbadtemperatur.

		Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern bei		Anmerkung
		25° C	37° C	
1	Kuhmilch, Mastit.	15,6	17,5	Nach Sistierung der Gasentwicklung bei 25° wurde die Temperatur auf 37° erhöht.
2	„ „	16,5	17,3	
3	„ „	16,6	17,1	
4	„ „	16,0	17,8	
5	„ „	7,6	9,6	
6	„ „	17,1	18,5	
7	„ „	10,2	11,8	
8	„ „	12,8	14,5	

Im besonderen wäre an diesem Apparat auszusetzen, daß der Wasserbehälter für eine stark katalasehaltige Milch nicht ausreicht, vielmehr eine Nachfüllung des Wassers bedingt, wobei selbstverständlich ein Gasverlust unvermeidlich ist. Ferner treibt bei ebensolcher Milch, deren Reaktion immer unter großer Schaumbildung vor sich geht, die vehemente Sauerstoffentwicklung infolge Raummangels im Milchbehälter den gebildeten Schaum und selbst Milchteile in derartiger Menge durch das Gasrohr in den Wasserbehälter, daß das Wasser ganz getrübt erscheint und deshalb, sowie wegen des Schaums das Ablesen und in weiterer Folge auch das Reinigen des Wasserbehälters erschwert ist. Außerdem ist bei diesem Katalaser ein größerer oder ein mehrmaliger Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu einer Milchprobe wegen des Raummangels unmöglich und die Einfüllung von sauerer, überhaupt viscoser Milch durch den engen unteren Tubus sehr schwer durchführbar. Aus diesen Gründen

und zur Behebung dieser angeführten, allerdings minimalen und nicht wesentlichen Mängel habe ich mir obigen Apparat bei der Firma Hugershoff in der Art modifizieren lassen, daß ich den Milchbehälter auf ca. 45 ccm, den Wasserbehälter auf 25 ccm Fassungsinhalt vergrößern, in dem Glasrohre unten vor Beginn der Gradeinteilung eine zirka erbsengroße, kugelförmige Erweiterung anbringen, den unteren Tubus erweitern und mit einem Gummistöpsel verschließen ließ. Dadurch scheinen wohl jene angeführten Fehler behoben, jedoch ist das über der Milch befindliche Luftquantum bedeutend vergrößert und ein, wenn auch geringer Fehler unvermeidlich. Diesen suchte ich durch Erwärmen des Milchbehälters samt der Milch auf die Temperatur des Wasserbades zu verkleinern, und tatsächlich haben vergleichende Untersuchungen (siehe nächste Tabelle) mit den „kleinen" und „großen Katalasern" nur ganz geringe Differenzen von 0,4 bis 0,9 ccm ergeben. Übrigens ist in dieser Tabelle bei der geringeren Katalasezahl der kleineren Apparate selbstverständlich bei katalasereicher Milch auch der Sauerstoffverlust bei dem Nachfüllen des Wassers zu berücksichtigen.

Verschiedenheit der kleinen und großen Katalaser.

		Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern bei		Differenz	Anmerkung
		kleinen Kat.	großen Kat.		
1	Kuhmilch, Mastit.	17,0	19,5	2,5	nicht gewärmt
2	„ „	17,1	19,3	2,2	„ „
3	„ „	6,0	7,5	1,5	„ „
4	„ „	5,3	6,5	1,2	„ „
5	„ „	6,7	8,0	1,3	„ „
6	„ „	3,0	4,5	1,5	gewärmt, aber 1 ccm aq. dest. zugesetzt
7	„ „	2,3	4,0	1,7	do.
8	„ „	3,0	3,5	0,5	gewärmt
9	„ „	3,1	4,0	0,9	„
10	„ „	3,6	4,0	0,4	„
11	„ „	5,9	6,5	0,6	„
12	„ „	3,1	4,0	0,9	„
13	„ „	3,0	3,5	0,5	„
14	„ „	1,2	2,0	0,8	„

Da diese Fehler bei diesen rekonstruierten großen Katalasern konstant sind, kommen sie wohl kaum in Betracht, zum mindesten nicht bei der praktischen Durchführung der Enzymmethode. Hugershoff hat mir unterdessen mitgeteilt, daß er bereits Katalaser mit größerem Wasserbehälter (25 ccm) und einem nur für etwas über 20 ccm berechneten Milchbehälter angefertigt hat.

Behufs Durchmischung der Milch mit dem zugesetzten Wasserstoffsuperoxyd ist ein kleiner, freier Raum oberhalb der Milch notwendig.

Über die Reihenfolge der Beschickung der katalasehaltigen Flüssigkeit und des Wasserstoffsuperoxydes gibt Leo Liebermann[1]) hinsichtlich der Fett- und Malzkatalase an: „Man müsse, um eine Katalasewirkung zu erkennen, die zu prüfende Flüssigkeit vorsichtig an der Wand der Eprouvette zur H_2O_2-Lösung fließen lassen, also zuerst H_2O_2 in den Apparat geben und dann erst das katalasehaltige Objekt zusetzen." Für Milch, insbesondere saure und andere viscose Milch ist nach meiner Erfahrung diese Reihenfolge nicht empfehlenswert, weil die Einfüllung derartiger Milch speziell in die Katalaser sich sehr umständlich gestaltet — bei manchen Milchsorten war die Einbringung mit der Pipette überhaupt unmöglich und mußte das bezügliche Quantum abgemessen werden — und bis zur vollständigen Einfüllung der Milch häufig 1 bis 2 Minuten verstreichen, welche Zeit genügt, um durch den Kontakt der ersten Milchteile mit dem Peroxyd bei dem meistenteils vehementen Reaktionsverlaufe derartiger Milch einige Kubikzentimeter Sauerstoff zu entwickeln, der dann selbstverständlich durch den noch offenen Milchtubus ungemessen entweicht. Auch bei dünnflüssiger Milch benötigt die Beschickung des Apparates mit 15 ccm längere Zeit als die von 5 ccm wässerigen, daher leichtflüssigen Wasserstoffsuperoxyds, abgesehen davon, daß eine vorherige Erwärmung der Milch nur in einem anderen Gefäße erfolgen könnte. Das zu untersuchende Milchquantum und die Menge des in verschiedener Konzentration benutzten H_2O_2 wurde von den einzelnen Forschern in beliebigem und ganz ungleichem Verhältnisse angewendet, und erst Koning[2]) hat bei der Mehrzahl seiner Versuche 15 ccm Milch und 5 ccm 1% H_2O_2 gemischt und hiermit eine sichere Basis für die Gleichmäßigkeit und Einheit weiterer Untersuchungen geschaffen.

Denn dadurch, daß der eine Forscher 1 ccm Milch mit 12 ccm 3% H_2O_2; (Friedjung und Hecht[3]), der andere 10 ccm Milch mit 5 ccm 1% H_2O_2 (Lam[4]), ein dritter[5]) 40 oder 100 ccm Milch mit beliebiger Menge von H_2O_2 vorschlägt, ist eine klare Übersicht über den Katalasegehalt der verschiedenen, insbesondere pathologischen Milchsorten nicht möglich und auch nicht festgestellt worden. Es ist gewiß Koning als Verdienst anzurechnen, wenn seine Versuche hinsichtlich der anzuwendenden Flüssigkeitsmengen die weiteren Forschungen in gleichmäßige Bahnen lenken. — Ich habe die meisten meiner Versuche in diesem Mengenverhältnisse 15:5, einige von 9:3 und in jenen wenigen Fällen, in denen ich nicht mehr als 3 ccm Milch erhalten konnte, auch von 3:1 angestellt (siehe folgende Tabelle;

---

[1]) L. und P. Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol.
[2]) Biol. u. biochem. Studien üb. Milch. 1906 u. 1908.
[3]) Arch. f. Kinderheilk. 37, 177, 1908.
[4]) Die Prüfung der Marktmilch. J. T. XXXVI, 1906.
[5]) Schellhase, Inaug.-Diss., Gießen.

Milch in verschiedenen Quantitäten.

Milchprobe Nr.	Beschaffenheit der Milch	Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern bei 15 ccm / 5 ccm Milch	10 ccm / 5 ccm Milch	9 ccm / 3 ccm Milch	6 ccm / 2 ccm Milch	3 ccm / 1 ccm Milch / H_2O_2	Anmerkung
1	Kuhmilch, norm.	5,1	3,2	3,2	—	2,6	
2	„ „	5,2	3,7	3,7	—	2,6	
3	„ „	1,5	0,8	—	—	—	
4	„ „	1,2	—	1,2	—	—	
5	„ Colostr.	3,8	—	2,7	—	—	8 Tage n. d. Kalben
6	„ „	13,0	—	12,0	—	—	
7	„ „	4,0	—	—	—	1,5	
8	Ziegenmilch, „	19,5	17,0	—	—	—	
9	Kuhmilch, güst.	21,0	—	—	—	5,0	
10	„ Mastit.	16,5	—	10,4	—	4,2	
11	„ „	22,7	15,1	10,7	—	4,6	
12	„ „	21,3	17,3	11,0	7,5	4,0	
13	„ „	17,0	—	10,8	—	—	Milch 1 Tag alt
14	„ „	18,3	17,0	10,8	—	—	
15	„ „	17,0	17,0	10,5	—	—	
16	„ „	13,0	15,2	—	—	—	
17	„ „	13,7	15,8	—	—	—	
18	„ „	15,6	17,1	10,2	—	—	
19	„ „	5,3	—	4,0	—	—	abgelaufene Mast.
20	„ „	16,5	—	9,8	—	4,5	
21	„ „	13,9	—	8,5	—	—	
22	„ „	19,0	—	13,0	—	—	
23	„ „	21,0	—	14,5	—	—	
24	„ Peritonit.	13,0	—	—	—	4,5	
25	„ „	5,8	4,3	—	—	—	
26	„ „	4,7	4,1	—	—	—	
27	„ „	10,0	7,5	—	—	—	

ich muß aber sagen, daß die Lobeckschen Katalaser bei geringeren Flüssigkeitsmengen als 15:5 gegenüber den Kontrollversuchen und den daraus berechneten, ziffermäßigen Resultaten, insbesondere beim Verhältnisse 3:1, meistens ein differierendes Ergebnis in der Art lieferten, daß die kleineren und kleinsten Mengen eine relativ höhere Katalasezahl zeigten, wobei jedenfalls der über der Milch befindliche Luftraum wieder eine wesentliche Rolle spielt. Hinsichtlich einer Milchmenge von 10ccm zu 5 ccm H_2O_2 konnte ich durch vergleichende Versuche (vorherige Tabelle) variierende Katalasezahlen feststellen in der Art, daß aus 10 ccm Milch bei niedrigem oder normalem Katalasegehalt eine geringere Sauerstoffmenge als aus 15 ccm entwickelt wurde, dagegen bei stark katalasehaltiger Milch bald absolut, bald relativ höhere, bald dem Verhältnis entsprechende Enzymzahlen erreicht wurden, was dadurch seine Erklärung finden dürfte, daß eine zum Milchquantum verhältnismäßig größere Peroxydmenge entsprechend dem engeren Verhältnisse (2:1) auch mehr Katalase spalten kann, vorausgesetzt, daß genügend Enzym zugegen ist. Dies beweisen

Mehrmaliger Zusatz von 5 ccm 1% H_2O_2 bzw. einer größeren Menge von H_2O_2.

Milchprobe Nr.	Beschaffenheit der Milch	Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern nach 1 maligem Zusatz von 5 ccm H_2O_2						Anmerkung
		1	2	3	4	5	6	
1	Kuhmilch, sauer	3,6	0,0	—	—	—	—	7 Tage alt
2	„ „	16,0	14,5	—	—	—	—	
3	Galak „	3,2	0,0	—	—	—	—	1 Tag alt
4	Ziegenmilch „	3,5	0,0	—	—	—	—	7 Tage alt
5	Schweinemilch, Col.	15,7	12,5	—	—	—	—	2,5 ccm Milch mit 5 ccm H_2O_2
6	Kuhmilch, güst.	21,0	20,0	16,5	—	—	—	
7[1])	„ „	—	20,0	—	—	—	—	
8[2])	„ „	—	20,0	—	—	—	—	
9[3])	„ „	—	13,0	—	—	—	—	
10	„ „	20,0	19,5	20,5	15,0	1,5	—	
11	„ „	21,0	19,0	—	—	—	—	
12	„ „	18,0	19,5	19,5	19,0	11,5	3,0	
13	„ Mast.	13,2	17,7	—	—	—	—	
14	„ abgel. Mast.	4,7	5,0	0,6	—	—	—	
15	„ „	4,8	3,4	0,5	—	—	—	
16	„ Mastit.	13,0	8,5	—	—	—	—	
17	„ „	13,0	8,5	—	—	—	—	
18	„ „	4,2	3,3	—	—	—	—	
19	„ „	21,5	6,0	—	—	—	—	
20	„ „	19,0	11,5	1,5	0,5	—	—	
21	„ traum.	10,5	2,0	1,5	—	—	—	blutig
22	„ Mast.	18,0	2,0	1,5	—	—	—	
23	„ „	2,0	2,0	1,0	—	—	—	benachbart. gesund. Viertel
24	„ „	2,5	1,3	0,5	—	—	—	
25	„ „	21,5	19,5	6,0	1,5	—	—	
26	„ „	17,5	16,0	—	—	—	—	
27	„ „	3,5	1,0	—	—	—	—	benachb. Viertel
28	„ „	4,5	1,0	—	—	—	—	„ „
29	„ „	8,0	2,0	—	—	—	—	
30	„ Magenkat.	6,5	0,5	—	—	—	—	
31[4])	„ Peritonit.	5,5	1,0	—	—	—	—	

[1]) Probe 7 wurde das erstemal mit 10 ccm H_2O_2 versetzt und gab 32,0 ccm O.

[2]) Probe 8 wurde das erstemal mit 15 ccm H_2O_2 versetzt und gab 45,0 ccm O.

[3]) Probe 9 wurde das erstemal mit 20 ccm H_2O_2 versetzt und gab 54,5 ccm O.

Alle 3 Proben (7, 8, 9) wurden das zweitemal mit 5 ccm H_2O_2 versetzt und gaben 20,0, 20,0, 13,0 ccm O.

[4]) Probe 31 gab mit 10 ccm H_2O_2 6,0 ccm O } nach Zusatz von weiteren 5 ccm H_2O_2 { 1,0 ccm O,
„ 31 „ „ 15 „ „ 6,5 „ O } { 1,0 „ O,
„ 31 „ „ 20 „ „ 7,0 „ O } { 1,5 „ O.

auch die Versuche mit verschiedenen Mengen von H_2O_2 in der nächsten Tabelle, wo katalasereiche Milch mit Wasserstoffsuperoxyd in steigenden Quantitäten (5.0, 10.0, 15.0, 20.0 ccm) versetzt, eine bedeutende progressive Steigerung des Sauerstoffes (9,0 bis 13,0), dagegen minder katalasehaltige Milch eine solche von nur 0,5 ccm zur Folge hat. Für die kleineren Flüssigkeitsmengen müßten daher die Katalaser, wenn man die Milch in den angeführten verschiedenen Mengen ohne Fehler untersuchen will, für 15, 9 und 3 ccm Milch, bzw. 20, 12 oder 4 ccm Inhalt, i. e. in verschiedenen Größen angefertigt oder aber der Milchbehälter verkleinert werden können. Daß durch die erwähnte Menge des 1%igen Wasserstoffsuperoxydes (5 ccm) nicht immer, insbesondere nicht bei hohem Katalasegehalte der Milch das gesamte in 15 ccm derselben enthaltene Ferment zersetzt wird, sondern nur ein äquivalenter Teil, der gerade genügt, das zugegebene H_2O_2 in seine Komponenten zu zerlegen, geht aus den Versuchen in der letzten Tabelle hervor, bei denen eine mehrmalige Beschickung mit H_2O_2 notwendig war, um den größten Teil der Katalase unwirksam zu machen. Dies zeigen aber auch die vergleichenden Versuche mit 15 und 10 ccm Milch (vorletzte Tabelle) und gleicher H_2O_2-Menge von 5 ccm, die bei niedrigem Katalasegehalte in 10 ccm relativ eine geringere Sauerstoffmenge, bei stark katalasehaltiger Milch sogar oft eine höhere Zahl als bei 15 ccm Milch ergaben. Warum aber das Peroxyd in Form von zwei Einheiten à 5 ccm, bei der einen Milch 18 + 2 (letzte Tabelle, Kuh Nr. 22), bei der zweiten 2 + 2 (Kuh Nr. 23) ccm Sauerstoff und nicht gleich bei der letzteren durch die erste Einheit 4 ccm entwickelt, läßt sich nur durch die Annahme erklären, daß das Katalasequantum, das die zweite Einheit H_2O_2 zersetzt, vorher gebunden war und durch die erste Reaktion, bzw. durch die erste H_2O_2-Menge frei wurde.

Bevor ich auf die Besprechung der einzelnen Versuche im besonderen eingehe, möchte ich noch einige Worte betreffend die Reinigung der Apparate hinzufügen. Es ist selbstverständlich, daß bei der Untersuchung eines Objektes, wie es die in minimalen Mengen auftretende Katalase ist, die gegen die mannigfaltigsten thermischen, chemischen, physiologischen und pathologischen Einflüsse ein äußerst labiles Verhalten zeigt, auch mit der peinlichsten Genauigkeit und unter Einhaltung aller in Betracht kommenden wissenschaftlichen Prinzipien vorgegangen werden muß, um wenigstens bei etwa auftretenden, abnormen Resultaten alle bekannten Ursachen ausschalten zu können; kam es mir doch vor, daß ich trotz aller Präzision auf ganz unerklärliche Zahlen stieß, die sich dann bei einem Kontrollversuch doch als richtig herausstellten und eben die Labilität der Katalase bewiesen. — Die Apparate wurden nach Beendigung des Versuches ausgeleert, ausgewaschen, der Wasserbehälter, in dem bei katalasereicher Milch Teile derselben an den Wänden und den Rohren angetrocknet erscheinen, mit warmem Wasser gefüllt und durch einige Stunden zur Gänze ins Wasser gestellt.

Danach erfolgte, sei es auf mechanischem Wege durch Bürsten, Sand, Seifensand oder durch chemische Lösungsmittel, wie Salmiakgeist, Äther oder Lauge, die vollkommene Reinigung und endlich das Sterilisieren (Auskochen). Ebenso wurden jedesmal die Metallverschlüsse und Gummistöpsel, die Probegläser samt den Stöpseln nach vorheriger Reinigung mit Bürsten durch einige Zeit (wenigstens $^1/_2$ Stunde) ausgekocht. Die Hände des Melkers sowie das Euter wurden, wo es halbwegs möglich war, vorher einer gründlichen Reinigung unterzogen, und in jenen Fällen, in denen es angezeigt erschien, wurde die Milch von den einzelnen Strichen direkt in die Gläser, sonst in einen gereinigten Eimer gemolken und von diesem in die Gläser gefüllt. Die 1%ige Wasserstoffsuperoxydlösung ließ ich mir jeden Tag frisch und genau herstellen, und zwar anfangs aus der 3%igen, später aus Perhydrol im Verhältnis von 1:29, welche Lösung konstanter und haltbarer ist und weniger Acidität zeigt, allerdings auch teurer zu stehen kommt. Behufs Erzielung einer konstanten Wärme des Wasserbades verwendete ich sogenannte „Nachtlichter", die mir unter Einhaltung ausgeprobter Entfernungen vom Wasserbade die Temperatur immer auf der gleichen Höhe von 37° hielten.

Nach diesen Ausführungen will ich nun meine Untersuchungsergebnisse der einzelnen Milchproben besprechen.

1. Normale Kuhmilch.

A. Lam[1]) sagt hierüber folgendes: „Normale Milch gibt eine Katalasezahl (Kubikzentimeter Sauerstoff aus 10 ccm Milch mit 5 ccm einer 1%igen H_2O_2-Lösung) von 0,3 bis 1,0; bei einer über 3,0 liegenden Katalasezahl ist die Milch unbrauchbar."

Auch Koning[2]) fand als Normalzahlen für Milchkatalase höchstens 25 mm, allerdings bei einem Mengenverhältnis von 15:5, nicht von 10:5. Wie schon erwähnt, habe ich immer das Verhältnis 15:5 eingehalten, und erscheint ein einheitliches Mengenverhältnis für die Gleichmäßigkeit der Resultate unbedingt notwendig. Die in den Tabellen angeführten Zahlen bedeuten die Kubikzentimeter des Gasvolumens für das angeführte Verhältnis 15:5.

Bei normaler, warmer Milch fand ich Zahlen von 0,7 bis 2,5; die weit darüber liegenden können wohl nicht als normal angesehen werden, trotzdem die betreffenden Euter keine krankhaften Veränderungen erkennen ließen.

---

[1]) Die Prüfung der Marktmilch. J. T. XXXVI, 1906.

[2]) Biolog. u. biochem. Studien üb. Milch. 1906 u. 1908.

Die gewöhnliche Mischmilch lieferte fast immer eine größere Sauerstoffmenge als 2,5, die einerseits mit der Beimengung von Milch pathologisch oder physiologisch abnormer Kühe, andrerseits auch mit dem höheren Alter der Milch in Zusammenhang zu bringen sind, da derartige Milch zur Zeit des Konsums zum mindesten 12 oder noch mehr Stunden älter ist als frisch gemolkene. Andrerseits kommt bei der Mischmilch auch der Zusatz von Natrium bicarbonicum, das häufig als Konservierungsmittel, besonders in der heißen Jahreszeit, der Milch beigegeben wird, in Betracht, in welchem Falle ebenfalls ein höherer Katalasegehalt vorgetäuscht werden kann. Auf 60° erhitzte Kuhmilch lieferte gegenüber der rohen Milch keinen wesentlichen Unterschied in der Katalasemenge.

2. Sauermilch.

Nach der Katalasemenge in der süßen Milch richtet sich selbstverständlich auch das Katalysierungsvermögen der im Anfangsstadium befindlichen sauren Milch, bei der (Mischmilch) ich Zahlen von 0,0 bis 12,4 wahrnehmen konnte. Hierbei ist das Alter der Milch von wesentlichem Einfluß, was auch Koning anführt und ich konnte die Beobachtung machen, daß bei jener Milch, die ich direkt von den Kühen erhielt, bei der ich also das Alter genau feststellen konnte, die Katalase am zweiten Tage stieg, um dann wieder zu fallen, später jedoch abermals, oft sogar ziemlich hoch emporzuschnellen. Bei Mischmilch tritt dieses Stadium ihrem Alter entsprechend natürlich früher ein. Bei älterer Sauermilch ist jedenfalls ebenso wie bei sauerem Rahm, der der natürlichen Aufrahmung unterzogen wurde, auch eine eventuell aufgetretene Schimmelbildung zu berücksichtigen, wodurch ebenfalls eine höhere Katalasezahl bedingt ist[1]); eine geringe Beimischung von Penicillium zu einer Milch von 3,6 ccm Sauerstoffentwicklung ergab eine Zahl von 20 ccm. Dieser Faktor ist speziell auf dem Lande, wo noch vielfach die natürliche Aufrahmung gebräuchlich ist und das Gemelke bis zum Butterrühren oft eine

[1]) Orla Jonsen, Centralbl. f. Bakt. II, 18, 211, zit. n. J. T. 2. XXXVII, 1907 (Ref. 259).

Woche lang in feuchten Kellern aufbewahrt wird, in Betracht zu ziehen.

Sauere Kuhmilch.

Probe	1	lieferte	12,4 ccm O	nicht gekühlt
„	2	„	0,6 „ „	Beide Proben 3 Stunden vor der Untersuch. im Eisschrank gekühlt
„	3	„	0,1 „ „	
„	4	„	0,0 „ „	Durch 24 Stunden im Eisschrank
„	5	„	1,0 „ „	„ 24 „ „ „
„	6	„	0,5 „ „	„ 24 „ „ „
„	7	„	0,2 „ „	nicht gekühlt
„	8	„	5,8 „ „	„ „
„	9	„	4,5 „ „	„ „
„	10	„	6,8 „ „	„ „

3. Buttermilch.

Dieselbe besitzt eine ziemlich bedeutende Katalysierfähigkeit, da die Versuche Schellhases (87) es ziemlich wahrscheinlich machen, daß die gesamte Katalase der Vollmilch in den Rahm übergeht und beim Buttern des Rahmes in der Buttermilch bleibt, da in der Butter selbst keine Katalase nachzuweisen ist. Ich konnte nur eine Probe von Buttermilch erhalten, die die Zahl 13 anzeigte.

Buttermilch.

Probe	1	lieferte	am Tage	der Gewinnung	13	ccm	O,
			nach 7 Tagen	„	7	„	O,
			„ 9 „	„	8,5	„	O.

4. Sauerrahm.

Dieser lieferte in 3 Proben eine hohe (17,2), eine mittlere (7,5) und eine niedere (4,0) Katalasezahl; die ersten zwei Proben waren von einer Milchverschleißerin, die dritte aus einer Molkerei bezogen.

Sauerrahm.

Probe	1	lieferte	17,2 ccm O	Beide Proben 1 und 2 von einer Milchverschleißerin,
„	2	„	7,5 „ „	
„	3	„	4,0 „ „	von einer Molkerei bezogen.

5. Yoghurt und Kefirmilch.

Die bulgarische Yoghurtmilch, von einer hiesigen Molkerei geliefert, ergab Enzymzahlen von 2,6 bis 6,0.

Ein interessantes Resultat erhielt ich bei der Untersuchung der Kefirmilch, die nach Vorschrift aus gekochter, gleichzeitig aus derselben ungekochten Milch mittels Kefirpastillen bereitet wurde. Ich fand nämlich den Katalasegehalt der letzteren (ungekochten) nach 48stündigem Gären um 1,2 geringer als den der ersteren (gekochten), trotzdem der Katalaser bei der Untersuchung der rohen Milch vor dem Ansetzen 8,5 ccm, am zweiten Tage 3,0 ccm Gasentwicklung anzeigte, man also eine höhere Katalasemenge bei der ungekochten erwarten sollte. Diese Differenz kommt auch bei den nach der Reife der Milch in den folgenden 3 Tagen auftretenden Steigerungen der Katalase beider Milchsorten zum Ausdruck und ist mutmaßlich in einem hemmenden Einfluß der Kefir-Hefe- und -Spaltpilze auf die Generatoren der Katalase oder umgekehrt zu suchen, während in der gekochten Milch die Kefirpilze sich frei und ungehindert entwickeln und ihre Stoffwechselprodukte ebenfalls in Form der Katalase bilden können.

Yoghurt und Kefirmilch.

Probe 1 Yoghurt lieferte 6,0 ccm O, im August untersucht,
„ 2 „ „ 3,5 „ „ „ März „
„ 3 „ „ 3,0 „ „ „ „ „
„ 4 „ „ 2,6 „ „ „ „ „

		1,	2,	3,	4,	5 Tage danach
Kefir[1]), Probe 1[2]) lief. v. d. Ansetz. 8,5 ccm,		3·0,	1·6,	1·2,	4·6,	9·9 ccm O
„ „ 2[3]) „ „ „ „	8,5 „	—	2·8,	4·3,	5·0,	12·0 „ „
„ „ 3[3]) „		—	4·2,	—	—	— „ „

6. Galak.

Ein Trockenmilchprodukt „Galak", erzeugt von der Firma G. Hamburger, Wien, Fulnek und Hagenberg, bereitet aus 60 g des Pulvers in $^1/_2$ l siedenden Wassers, zeigte am Tage der Zubereitung gleich nach dem Erkalten selbstverständlich keine Katalase, in den nächsten Tagen eine ähnliche Sauerstoffmenge mit denselben Schwankungen wie gewöhnliche Kuhmilch an, während ein mit

[1]) Für Probe 1 und 2 wurde die gleiche Milch verwendet.
[2]) Aus ungekochter Milch bereitet.
[3]) Aus gekochter Milch bereitet.

Galak.

	Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern aus Galak in einem Alter von Tagen													Am 5. Tage sauer
	gleich nach der Bereitung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	15	
Probe 1, aus siedend. Wasser bereitet	0,0	—	3,2	—	2,0	10,5	6,0	0,5	—	2,1	—	11,0	—	—
„ 2 „ „ „	0,0	2,4	4,1	2,1	2,1	—	12,0	—	—	—	—	—	—	—
„ 3 „ „ 30° warm. „	1,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

30° warmen Wassers bereitetes derartiges Surrogat gleich nach der Herstellung 1,5 ccm Sauerstoff lieferte. Es enthält somit dieses Trockenmilchprodukt ebenfalls Katalase in natura, die bei Zusatz von derart temperiertem Wasser, das die Katalase nicht zerstört, zur Wirkung kommt.

7. Ziegenmilch.

zeigte in 4 Fällen ein geringes Katalysierungsvermögen (0,5 bis 1,0 ccm), während die Milch von einer jungen Ziege, die noch nie trächtig gewesen und trotzdem täglich $1^1/_2$ bis 2 l Milch gab, eine größere Katalasemenge (3,0 ccm) entwickelte, die sich bei höherem Alter der Milch in den folgenden Tagen bedeutend steigerte. Eine Ziege, die vor mehreren Monaten Zicklein geworfen hatte, zeigte eine Katalasezahl von 9,5, die sich in den folgenden Tagen mit zunehmendem Alter der Milch um mehr als die Hälfte verminderte. Krankheitserscheinungen waren bei diesen Tieren nicht nachweisbar. Jedoch erwähnt Cohn[1]) daß es Tiere (Ziegen) gibt, bei denen ein erheblicher Gehalt der Milch an Colostrumkörperchen während der ganzen Laktation persistiert.

8. Colostralmilch.

Speziell bei der Colostralmilch des Rindes machte ich die Wahrnehmung, daß das erste Colostrum sofort nach dem Kalben sehr stark katalysiert (bis zu 19,5 ccm O); wenn jedoch das Kalb, sei es auch am Tage der Geburt, kurz

[1]) Sommerfeld, Handb. d. Milchkunde, 1909, S. 68.

vorher schon gesaugt hat, ist bei der nachher abgenommenen Portion die entwickelte Sauerstoffmenge bedeutend geringer (ca. der dritte Teil), was auch in den nächsten Tagen nach der Geburt, wenn vor der Probeentnahme die Kuh schon gemolken wurde, der Fall ist. Dieses gegenüber Koning bei normaler Milch differierende Ergebnis läßt sich vielleicht in der Art erklären, daß mit der größeren ersten Fraktion auch der größere Teil der Colostrumkörperchen ausgemolken wurde, daher in dem im Euter noch befindlichen Milchrest, der als Probe abgenommen wurde, eine relativ geringere Anzahl dieser Leukocyten vorhanden war. Mehrere Tage vor dem Kalben abgenommene Milch zeigte auch in 2 Fällen eine hohe Katalasezahl (15,8 und 20,0), in einem dritten Falle allerdings nur eine mittlere (8,0). Colostralmilch von einem hy-

Ziegenmilch.

	Sauerstoffentwicklung in Kubikzentimetern aus Milch in einem Alter von Tagen														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	15		
Probe 1, von ein und derselben Ziege { 1. Strichen	1,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
2. „	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
6 Std. später untersucht { 1. „	0,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
2. „	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Probe 2, von ein und derselben Ziege { 1. Strichen	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
2. „	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
6 Std. später untersucht { 1. „	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
2. „	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Probe 3, von einer jungfräulichen Ziege	3,0	0,7	—	9,2	5,8	9,1	—	—	—	—	—	—	—		
do. 4 Tage später abgenommen	3,1	11,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
do. noch 1 Tag später „	1,6	4,7	6,0	4,8	4,0	—	—	8,0	9,2	—	9,5	10,1	11,2		
Probe 4, Ziege vor mehreren Monaten geworfen . . .	9,5	7,4	—	6,0	4,1	—	—	—	—	—	—	—	—		
do. 4 Tage später abgenommen	3,5	15,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

perämischen (der Milchmeier gebrauchte hierfür den Ausdruck „flossig") bzw. entzündeten Euter, das vorübergehend eine bedeutende Umfangsvermehrung, höhere Temperatur und geringe Schmerzhaftigkeit zeigte und dessen Milch immer Blut in verschiedener Menge beigemischt enthielt, wies selbstverständlich entsprechend dem Katalasegehalt des Blutes eine größere Katalasemenge auf als normales Colostrum am gleichen Tage nach der Geburt. Ungefähr nach 8 Tagen, manchmal früher, manchmal später [Koning gibt 14 Tage an] fand ich wieder den normalen Katalasegehalt vor. Eventuelles Anhalten desselben oder Steigerungen nach dieser Zeit sind größtenteils auf eine noch bestehende oder frisch aufgetretene Euterhyperämie zurückzuführen. — Ziegencolostrum nach der Geburt zeigte ebenfalls eine hohe Katalasezahl (19,5), in einem Falle nur eine mittlere (8,0); diese wurde allerdings erst am Vormittage nach dem abends vorher erfolgten Werfen abgenommen und die Jungen hatten jedenfalls schon einen Teil der Milch abgetrunken. Auch die Colostralmilch von Schweinen, die dünnflüssiger als die von Rindern, gelb und stark klebrig ist, entwickelte eine höhere, allerdings nur mittlere Sauerstoffmenge (12,0).

9. Milch güster Kühe.

Eine abgemolkene, güste Kuh am Ende der Lactationsperiode, von der ich Gelegenheit hatte, Milchsekret durch $5^1/_2$ Monate nach dem Trockenstehen in verschiedenen Intervallen zu untersuchen, lieferte am 1. Tage der Beobachtung (einige Tage nach dem Trockenstellen) auf allen 4 Strichen ein dickes, gelbliches, rahmartiges Sekret mit zahlreichen eiterähnlichen Gerinnseln, das noch nach 4monatlicher Aufbewahrung die gleiche rahmartige Beschaffenheit mit einem deutlichen Geruch nach ranziger Butter erkennen ließ. Mastitis war vorher keine zugegen gewesen. Das Sekret wurde im Laufe der Beobachtungsdauer immer dünnflüssiger, die festen Bestandteile in demselben immer geringer, so daß nach 4 Monaten eine geringe, serumartige Flüssigkeit von gelblicher Farbe und wässeriger Beschaffenheit mit ganz geringen festen Elementen, starker Schaumbildung beim Melken oder Schütteln und sehr stark alkalischer Reaktion (3,5 bis

4 Aciditätsgrade) ausgemolken werden konnte. Diese beiden Milcharten hatten eine bedeutende katalytische Eigenschaft mit einer Katalasezahl von 15,2 bei der ersten Probe, nach 4monatlichem Aufbewahren der Milch 22,5, und 21,0 bei der letzten Probe nach $5^1/_2$monatlichem Trockenstehen der Kuh. Der Katalasegehalt dieser Milch war in summa der größte aller von mir untersuchten Milcharten, was ich daraus schließe, daß nach 6maligem Zusatze von je 5 ccm, also im ganzen von 30 ccm H_2O_2 zu einer und derselben Milchmenge von 15 ccm sich noch 3 ccm Sauerstoff entwickelten, daß ferner bei den 4 ersten Zusätzen von H_2O_2 jedesmal eine beinahe gleich hohe Sauerstoffmenge von 19,0 ccm, beim fünften Male 11,5 ccm, im ganzen 90,5 ccm O (s. 5. Tab. Nr. 12) sich entwickelten, während bei Mastitismilch mit einem ebenfalls sehr bedeutenden Katalasereichtum ein mehrmaliger Zusatz von je 5 ccm H_2O_2 schon beim dritten Male nur 6,0, beim vierten Male 1,5 ccm, also im ganzen 48,5 ccm O lieferte (s. 5. Tab. Nr. 25). Die mikroskopische Untersuchung der am 1. Tage abgenommenen Güstmilch zeigte eine bedeutende Vermehrung der Leukocyten ohne Bakterien, bei der am letzten Beobachtungstage abgemolkenen Milch zahlreiche Streptokokken mit einem geringen Leukocytengehalte.

Dieser Befund stimmt mit der Auffassung Czernys [zit. nach Koeppe[1]) überein, nach der Colostrumkörperchen in der Milch der Frau das Stattfinden einer Milchstauung und Milchresorption bedeuten. Nach einer Milchstauung von 4 bis 5 Tagen treten Colostrumkörperchen auf. Allein nicht nur bei vollständiger Unterbrechung der Lactation, sondern auch bei ungenügender Entleerung der Milchdrüse finden sich die Colostrumkörperchen in der Milch, und ihr Befund zeigt an, daß die Milchsekretion im Erlöschen begriffen ist. Nach Rullmann und Trommsdorff[1]) wäre auch bei der Kuh das Auftreten zahlreicher Leukocyten in der Milch ein Zeichen des Nachlassens der Milchproduktion. Und in weiterer Schlußfolgerung und Anwendung der Ansicht Czernys auf die Kuh würde ein ungenügendes Ausmelken des Euters die Bildung von Colostrumkörperchen begünstigen, ein Moment, das die Labilität der Katalase, ins-

[1]) Sommerfeld, Handb. d. Milchkunde. S. 141 ff.

besondere den höheren Gehalt der Milch an diesem Enzyme bei abgelaufener Mastitis und damit verbundener Verminderung der Milchmenge, bzw. allmählicher Agalactie bei Abwesenheit von Streptokokken teilweise erklären würde. Denn wenn die Kuh auf einem Strichen weniger Milch gibt, erfolgt seitens des Melkers gewiß nicht regelmäßig und auch nicht vollständig das Ausmelken des betreffenden Viertels.

Andrerseits wird durch verschiedene Ursachen, auch schmerzhafte, äußere Euterkrankheiten, wie Euterpocken usw., ferner beim Zurückhalten der Milch seitens der Tiere sehr häufig ein vollständiges Ausmelken des einen oder anderen Strichens oder aller Viertel unmöglich gemacht, wodurch eben auch der Katalasegehalt jeweilig vermehrt würde.

In weiterer Folge würde dann auch die Zunahme der Katalase bei gewissen physiologischen (Rindern usw.) und pathologischen Prozessen — siehe weiter unten —, bei denen der Einfluß von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten, den Toxinen, ausgeschaltet werden kann, durch Verminderung der Milchmenge und dadurch bedingtes, wenigstens nicht vollkommenes Ausmelken ihre Erklärung finden, um so mehr, als nicht in allen Fällen gleichartiger Krankheiten oder physiologischer Vorgänge derselben Art es gelingt, eine Vermehrung der Katalase nachzuweisen. Jedenfalls sind zur Klarstellung dieses Kapitels noch eingehende Forschungen notwendig.

10. Mastitismilch.

Euterentzündung, diese häufiger, als man glaubt, auftretende Euterkrankheit habe ich in zahlreichen Fällen, sowohl im Beginne, als auch während des ganzen Verlaufes und auch nach dem anscheinenden Zurückgehen des Prozesses auf Milchkatalase untersucht und kann nur, wie bereits allgemein sichergestellt ist, bemerken, daß die Katalase in der Milch mastitiskranker Rinder von allen von mir untersuchten Milchsorten bei einmaliger Beschickung mit 5 ccm H_2O_2 die höchste Zahl (23 und selbst darüber) aufweist, die jedoch mit dem anscheinenden Rückgange des Prozesses, d. i. also mit dem Verschwin-

den der äußerlichen Entzündungserscheinungen und dem Zurückkehren der Milch zur anscheinend normalen Beschaffenheit nicht gleichzeitig und nur allmählich auf das Normale sinkt, so daß ein mittlerer oder wenigstens abnormal höherer Katalasegehalt noch nach Wochen und selbst Monaten, zu einer Zeit, wo am Euter keinerlei Entzündungserscheinungen, mitunter höchstens eine geringe Vergrößerung mehr zugegen ist und wo die Milch, abgesehen von einer geringeren Quantität, äußerlich keine Veränderung zeigt, nachweisbar ist. Allerdings liefert gewöhnlich die Gärprobe durch späteres und unregelmäßiges Gerinnen der Milch, durch Ansammlung von Gasblasen, Veränderung des Geruches für die pathologische Beschaffenheit der Milch Anhaltspunkte; ebenso ist meistens die Alkalescenz bei solcher Milch eine bedeutendere.

Die Untersuchung auf Katalase gibt dem Tierarzt eine leicht und schnell durchzuführende Methode an die Hand, die sogenannte Dreistrichigkeit bei Kühen, bzw. einen auf einem Strichen bestehenden Milchmangel mit einer vorausgegangenen Mastitis in zweifelloser Weise in Zusammenhang zu bringen; denn eine Vermehrung der Katalase auf einem Euterviertel fand ich nur immer bei einer abgelaufenen oder noch bestehenden Mastitis, bei anderen allgemeinen Krankheiten tritt die Erhöhung dieses Enzymgehaltes nicht auf einem, sondern auf allen vier Vierteln auf, ebenso bei anderen Euterkrankheiten, ausgenommen bei Euterfurunkulose, die jedoch äußerlich leicht festzustellen ist. In der Zeit, während der ich mich mit Katalaseuntersuchungen befasse, hatte ich mehrmals Gelegenheit, für solche dreistrichige Handelskühe wegen dieses Fehlers Zeugnisse auszustellen, und die Enzymmethode leistete mir hierbei nicht zu unterschätzende Dienste, da ich nicht allein nach den oft unsicheren Angaben des Besitzers oder nach dem zweifelhaften Ergebnisse des umständlichen Probemelkens, sondern einfach aus dem Untersuchungsergebnis der Milch auf Katalase auf eine abgelaufene Mastitis und eine dadurch bedingte geringe Milchergiebigkeit schließen konnte. Auch konnte ich in mehreren Fällen bei Kühen, zu denen ich wegen einer anderen Krankheit gerufen worden war und deren Milch ich, und zwar jedes einzelnen Viertels, der Katalaseprobe

unterzog, eine höhere Katalasezahl eines Strichens feststellen und auf Befragen des Besitzers die Mitteilung erhalten, daß die Kuh vor so und soviel Wochen an einer „Euterhitze" dieses Viertels laboriert hatte und seitdem auf demselben weniger Milch lieferte. Zu dem gleichen Resultat kommt auch Koning, der diese „Enzymmethode" zur Aufspürung kranker Euter zwecks Ausschaltung der betreffenden Kuh von der Milchlieferung benützte. Und mit Recht! Denn derartige Milch kann wohl nicht als normal angesehen werden, zum mindesten unterscheidet sie sich durch ihre Eigenschaften von normaler Milch, wie durch den Aciditätsgrad, die Gerinnungsverhältnisse, mitunter auch noch durch den Bakteriengehalt. Derartige Milch verursacht nach Mogendorff[1]) bei der Käsebereitung eine sogenannte Blähung des Käses, einhergehend mit Gasbildung und bedingt eben ein schlechtes Produkt. Auch beim Buttern dürfte derartige Milch von schädlichem Einflusse sein. Und daß der Genuß solcher roher Milch auf die Gesundheit des Konsumenten schädigend wirken kann, ist wohl nicht fraglich. Die Katalase weist in den meisten Fällen von Mastitis ein inkonstantes Verhalten auf, d. h. sie ist zahlreichen durch noch unbekannte chemische, thermische und andere Ursachen bedingten Schwankungen, Exacerbationen und Remissionen unterworfen, die auch bei den Untersuchungen derselben Milch von verschiedenen Melkzeiten eines Tages sowie von Milch ein und desselben Tages in verschiedenen Altersstufen, wenn auch in geringerem Grade, zutage tritt. Diese oft sehr bedeutenden Unterschiede in dem Katalasegehalt sind hauptsächlich in dem späteren Verlaufe von Mastitis, wenn die Milch schon mehr gleichmäßig erscheint, wahrnehmbar; in einem Falle, in dem das Milchsekret seit Beginn der Erkrankung jeden Tag permanent unregelmäßig, gelbwässerig war und zahlreiche Gerinnsel enthielt, ließ sich eine gewisse Konstanz des Katalasegehaltes erkennen, die jedenfalls durch die Heftigkeit der Entzündung und das Übergreifen derselben auf zwei andere Viertel, welche Ausbreitung auch nach der Schlachtung konstatiert wurde, bedingt war. In den Schwan-

[1]) S. J. M. Mogendorff, Die Milchuntersuchung vom tierärztlichen Standpunkte. Ing.-Diss., Schoonhoven.

kungen läßt sich eine gewisse Periodizität nicht von der Hand weisen und dieselbe dürfte mit der Brunst, die dazwischen liegenden Steigerungen und Senkungen mit anderen noch nicht aufgeklärten Ursachen zusammenhängen. Wenigstens konnte ich bei zwei Kühen zur Zeit des Rinderns einen etwas höheren Katalasegehalt nachweisen als tags vorher, was auch Koning anführt. Weiter ist mir aufgefallen, daß sehr häufig außer in der Milch des kranken Euterviertels auch noch in der eines zweiten und sogar vereinzelt eines dritten, bald des angrenzenden, bald aber auch des gerade entgegengesetzten Viertels vorübergehend ein höherer Katalasegehalt, der allerdings innerhalb weniger Tage wieder zum Normalen zurückkehrt, nachzuweisen war, ohne daß diese zweite oder dritte Drüse irgendwelche Entzündungserscheinungen gezeigt hätte. Beimischungen von Blut, sei es infolge eines Traumas, das gewöhnlich im weiteren Verlaufe zu einer Mastitis führt, sei es infolge einer primären Entzündung oder Hyperämie, ergeben eine höhere Katalasezahl; dieselbe richtet sich nach der Menge des beigemischten Blutes. Eine Kuh, bei der das eine Viertel bedeutend vergrößert, fluktuierend und schmerzhaft war (Hämatom infolge einer mechanischen Einwirkung, wahrscheinlich eines Trittes der benachbarten Kuh beim Bahntransporte), gab anfangs ein beinahe rein blutiges Milchsekret, sogar mit Blutgerinnseln, das im Laufe der nächsten Tage eine Rosafarbe annahm, um nach ca. 20 Tagen die normale Farbe und das gewöhnliche Aussehen, jedoch noch höheren Katalasegehalt zu zeigen. Der Katalasegehalt betrug anfangs 20,0, nahm allmählich in den nächsten Wochen ab, zeigte aber noch nach ca. 2 Monaten eine geringe, wechselnde Erhöhung des Fermentes. Purulente Milch zeigte ein starkes katalytisches Vermögen. Geringer war dasselbe bei Abscessen oder nekrotischen Stellen im Euter.

11. Andere Euterkrankheiten.

Eine geringe Erhöhung der Katalasezahl über das Normale fand ich bei Euterpocken und Euterfurunkulose, In der dicken, gelbgefärbten, flockigen, sehr stark alkalischen Milch einer Kuh, bei der nach der Schlachtung Euter-

und Lungentuberkulose konstatiert wurde, war dagegen ein sehr hoher (21,5) Katalasegehalt nachzuweisen.

Milchfehler scheinen gleichfalls mit einer Vermehrung der Katalase einherzugehen, wenigstens konnte ich bei einer ranzigen (vom Wirtschafter fettranzig genannten) Milch, die bei der Gewinnung außer einer deutlichen alkalischen Reaktion keine abnorme Veränderung, jedoch nach 24 Stunden einen ranzigen Geschmack und selbst Geruch sowie noch alkalische Reaktion zeigte, eine höhere Katalasezahl (nach den einzelnen Vierteln 3·0, 5·0, 4·5, 5·0) nachweisen. Eine zweite Kuh aus demselben Stalle und mit demselben Milchmangel lieferte aus der Milch aller 4 Viertel zusammen 6 ccm Sauerstoff, bei der zweiten Untersuchung der einzelnen Viertel 1·0, 12·5, 3·9 und 11·5 ccm, bei der dritten Untersuchung am darauffolgenden Tage 3·0, 14·0, 7·0 und 18·0 ccm, also eine höhere Katalasemenge auf allen 4 Strichen. Die Reaktion der Milch war nach dem Melken am 2. und 4. Strichen stark, am 1. schwach, am 3. deutlich alkalisch, in der gleichen Stärke auch nach 24 Stunden noch nachweisbar. Diese beiden Kühe waren schon über 2 Jahre in diesem Stalle eingestellt und hatten nie während dieser Zeit eine Mastitis, zeigten auch äußerlich keine Veränderungen am Euter und erhielten dasselbe Futter wie die übrigen. Der Rasse nach waren sie reine Montavoner. Jedenfalls dürften bei anderen Milchfehlern auch höhere Katalasezahlen gefunden werden.

12. Innere Krankheiten.

Die Untersuchung der Milch von mit anderen als Euterkrankheiten behafteten Kühen ergab ein verschiedenes Resultat.

Magenkatarrhe hatten in vier Fällen eine geringe Steigerung der Katalase zur Folge, während in drei Fällen keine Vermehrung derselben eintrat; zum mindesten erreichte die Menge der Katalase nicht 2 ccm.

Chronische Nephritis (nach der Schlachtung bestätigt) lieferte 1,2 ccm Sauerstoff, traumatische Pneumonie sowie eine Periarthritis an mehreren Gelenken (Diagnose nach der Schlachtung bestätigt), zugleich mit einem Hämatom an der Hinterbacke verbunden, eine geringe Steigerung der normalen Katalasezahl, Lungentuberkulose allein ohne

Eutertuberkulose, mit einer Vergrößerung der Lymphdrüsen ohne tuberkulöse Entartung einhergehend, ein sehr hohes Sauerstoffquantum (21,0 ccm). Die Lungentuberkulose wurde nach der Schlachtung konstatiert. Auffallend war das Untersuchungsresultat bei Peritonitis. Ich habe hierbei die Wahrnehmung gemacht, daß sich die Katalasemenge nach der Schwere des Falles und der Intensität des Prozesses richtet. Je heftiger die Krankheitserscheinungen auftraten, je ausgebreiteter die Entzündung, je vorgeschrittener der Prozeß war, eine desto höhere Katalasezahl ergab die Milchuntersuchung. Andrerseits konnte beim Zurückgehen des Prozesses, mit eintretender Besserung auch eine Abnahme der Enzymmenge konstatiert werden, so daß ich aus derselben jederzeit auf den Rückgang der Entzündungserscheinungen schließen konnte und eine Wiederkehr der Rumination, eine Besserung der Freßlust und der Herztätigkeit stets einen Abfall der Katalasemenge zur Folge hatte. Umgekehrt hält sich bei ungünstigem Ausgange die Katalasemenge auf der gleichen, sehr bedeutenden Höhe (18 bis 19). Die Abnahme des Enzymgehaltes erfolgte gewöhnlich bei günstigem Ausgange in den ersten 3 bis 4 Tagen. Es läßt sich somit bei dieser Krankheit, sowie jedenfalls bei anderen inneren Krankheiten die Katalasebestimmung in prognostischer Hinsicht sehr gut verwerten und gibt dem Tierarzte sichere Anhaltspunkte sowohl für die Diagnose als auch für die Vorhersage an die Hand. Denn ich konnte bei keiner anderen der von mir beobachteten inneren Krankheiten auf allen 4 Vierteln eine derart hohe (10,0 bis 13,0, ja selbst 18,0 bis 20,0) Katalasezahl finden als bei Peritonitis, womit nicht gesagt sein soll, daß bei Seuchen, wie z. B. Maul- und Klauenseuche,[1]) Milzbrand usw., ein gleich hoher Katalasegehalt vorhanden sein kann. Jedoch kommen diese Epizootien in differential-diagnostischer Hinsicht für Bauchfellentzündung weniger in Betracht.

In einem Falle von Peritonitis mit ungünstigem Ausgange zeigte sich gleich bei Beginn eine sehr hohe (18,0) Enzym-

[1]) Mogendorrff, Milchuntersuchung, Ing.-Diss. Schoonhoven. S. 68.

zahl, die bis zu der am 4. Tage der Krankheit erfolgten Schlachtung, bei der das Fleisch wegen allgemeiner Peritonitis konfisziert wurde, auf gleicher Höhe blieb. Nach den einzelnen Zitzen lieferte die dicke, rein weiße (vom Besitzer als „schleimig" bezeichnete) Milch in den vier Fällen, wo ich den Prozeß durch mehrere Tage zu beobachten Gelegenheit hatte, im Anfange ein verschieden hohes Resultat (14,5 bis 20,0), das in dem ungünstigen Falle gegen das Ende der Krankheit auf jedem Viertel ziemlich gleichmäßig erschien.

Bei einer anderen Kuh, die nachträglich auf die Rinderklinik der Tierärztlichen Hochschule in Wien überstellt wurde und bei der Herr Prof. Dr. Reisinger eine umschriebene, traumatische Peritonitis konstatierte, konnten nur von allen vier Strichen im ganzen 3 ccm Milch gewonnen werden, deren Katalyse mit 1 ccm H_2O_2 5,1 ccm Sauerstoff ergab. Euterkrankheiten waren in diesen Fällen ausgeschlossen. Bei dieser Krankheit dürfte die bereits früher erwähnte Ansicht verschiedener Forscher [Leon Bier[1]), Koning[2]), Mogendorff[3])] zutreffen, daß die Stoffwechselprodukte der die Peritonitis bedingenden Mikroorganismen, die Toxine, die ins Blut übergehen, unter anderen durch die Milchdrüse zur Ausscheidung gelangen und so die stärkere Peroxydkatalyse hervorrufen, was auch bei Tuberkulose der inneren Organe ohne die der Milchdrüse der Fall zu sein scheint.

Eine interessante Beobachtung in einem weiteren Falle möchte ich noch erwähnen. Diese Kuh gab, seitdem sie im Besitze des Milchmeiers, d. i. seit über $^1/_2$ Jahr, ist, an dem rechten hinteren Strichen immer eine geringere Menge Milch. Am 1. Tage der Erkrankung konnte ich nun bei der Milch dieses Viertels eine Enzymzahl von 7,0, bei der der anderen Strichen von 5,8, 4,3 und 8,2 konstatieren, am 2. Tag stieg der Katalasegehalt der übrigen drei Milchdrüsen auf 9·3, 10·7 und 10·0, während der der ersterwähnten Drüse auf 4,8 fiel; am 3. Tage trat rechts hinten abermals eine sehr bedeutende (auf 12,0), bei zwei anderen Strichen eine geringe Steigerung, links hinten ein Abfallen der Katalase von 10,7 auf 9,0 ein. Am 4. und 5. Tage fand ich rechts hinten einen neuerlichen rapiden Abfall auf 6,5, bzw.

[1]) Über die Katalase in der Milch. J. T. XXXV, Ref. 230.

[2]) Biolg. u. bioch. Studien üb. Milch 1906 u. 1908.

[3]) Mogendorff, Milchuntersuchung, Ing. Diss. Schoonhoven.

3,0 ccm. Ich erkläre mir diese Schwankungen dadurch, daß das betreffende Euterviertel infolge einer sehr alten, längst abgelaufenen Mastitis in seiner Funktionsfähigkeit gelitten hatte, daher die auszuscheidenden Toxine die Drüse mit ihrem fehlerhaften Baue nicht so leicht passieren konnten, sich somit anhäuften, um dann in um so größerem Umfange am anderen Tage ausgeschieden zu werden. Für den folgenden Tag machte sich die fehlerhafte Funktionsfähigkeit wieder geltend und daher der plötzliche Abfall von 12,0 auf 6,5, worauf bereits ein Rückgang der Krankheit eintrat. Zum Schlusse war in den beiden hinteren Vierteln die Katalasemenge am geringsten. Wir sehen auch bei Vergleichung der Resultate der einzelnen Strichen an den verschiedenen Tagen, daß dieselben bei einem und demselben Viertel nicht gleichmäßig fallen oder steigen, sondern daß die Katalasemenge heute mehr, morgen weniger beträgt, während bei einer anderen Zitze das gerade umgekehrte Verhältnis auftritt.

Aus den angeführten Versuchen glaube ich nun folgende Schlüsse ziehen zu können:

1. Dr. Lobecks Katalaser eignen sich infolge ihrer im Prinzipe neuen, sehr guten und exakten Konstruktion, ihrer kompendiösen Form, der leichten und bequemen Handhabung und Beschickung, sowie ihres geringen Raumbedarfes ganz besonders und mehr als die anderen ähnlichen Apparate zur praktischen Massenuntersuchung der Milch auf ihren Katalasegehalt, stellen überhaupt den einfachsten Apparat dieser Art dar und stehen an Exaktheit, insbesondere in ihrer verbesserten Form den übrigen Apparaten dieser Art gewiß nicht nach.

2. Ein höherer Katalasegehalt der Milch kann auch durch Zugabe von Natrium bicarbonicum, einem beliebten Milchkonservierungsmittel, vorgetäuscht werden, daher wäre immer die Milch vorher auf den Gehalt von Natrium bicarbonicum mittels Rosolsäure oder nach Lelli[1]) mittels gesättigter Aspirinlösung zu prüfen.

3. Katalasereiche Milch reagiert in frischem Zustande größtenteils in verschieden hohem Grade alkalisch.

4. Für manche Fälle war trotz des Überschreitens

[1]) Rievel, Handb. d. Milchkunde 1907, S. 144.

von 2,5 ccm keine Ursache in Form einer Euter-erkrankung oder eines anderen Leidens zu finden.

5. Mischmilch zeigt infolge des höheren Alters derselben, mitunter wahrscheinlich auch infolge Beimengung von pathologischer Milch stets höhere Katalasezahlen.

6. Der Katalasegehalt der Sauermilch steht mit jenem derselben Milch in frischem Zustande in direktem Verhältnisse. Hierbei kommt ebenso wie bei Sauerrahm eine eventuelle Schimmelbildung als Faktor für die Erhöhung der Katalase in Betracht.

7. Auch die bulgarische Sauermilch „Yoghurt" sowie Kefirmilch liefern höhere Katalasezahlen und speziell bei letzterer ist die Enzymmenge dem Alter der Milch, vom Tage der Reife an gerechnet, proportional.

8. Eine aus dem Trockenmilchprodukt „Galak" nach Vorschrift mit siedendem Wasser zubereitete, also künstliche Milch läßt bereits 1 bis 2 Tage nach der Herstellung eine der normalen Milch gleichkommende Katalasezahl nachweisen.

9. Ziegenmilch zeigt im allgemeinen eine minimale, mitunter eine unerklärlich höhere Katalasemenge, die ebenso wie Kuhmilch mit zunehmendem Alter der Milch meistens eine Steigerung erfährt.

10. Colostralmilch gibt sowohl bei Rindern, als auch bei Ziegen und Schweinen regelmäßig eine hohe Katalasezahl, die dann, wenn kurz vor der Probeentnahme, sei es durch Melken oder Saugen des Jungen, Milch aus dem Euter entfernt wurde, nur eine mittlere Höhe erreicht. In abnorm höherem Maße läßt sich das Enzym ungefähr bis 8 Tage nach der Geburt finden; höhere Zahlen nach dieser Zeit sind meistens auf eine entweder frisch aufgetretene oder von früher her bestehende Euterentzündung zurückzuführen.

11. Milch von güsten und gleichzeitig trocken stehenden Kühen enthält nach längerem Aussetzen der Laktation eine sehr hohe Katalasemenge; als Totalsumma, konstatiert durch öfteres Beschicken mit H_2O_2 bis zur vollständigen Zersetzung der Katalase, wohl die höchste Ziffer von allen Milcharten.

12. Mastitismilch enthält nicht nur im Beginne der Erkrankung, sondern auch im weiteren Verlaufe der-

selben, sowie nach dem Schwinden der Entzündungserscheinungen, also zu einer Zeit, wo die Milch anscheinend normal ist und am Euter meistens keine äußerlichen und innerlichen Veränderungen mehr wahrnehmbar sind, eine in verschiedenem Maße erhöhte Katalasemenge. Dieselbe nimmt nach der Heilung der Mastitis allmählich ab, ist jedoch während dieses auf Wochen und Monate sich erstreckenden Rückganges zahlreichen, mitunter plötzlichen Schwankungen, die oft nur einen Tag, oft auch längere Zeit währen, unterworfen; eine gewisse Periodizität läßt sich nicht von der Hand weisen. Die Schwankungen sind teils durch physiologische (Rindern), teils durch pathologische sowie andere noch unbekannte Einflüsse bedingt. Mit Rücksicht auf diesen andauernd erhöhten Katalasegehalt läßt sich die Enzymmethode zur Feststellung der „Dreistrichigkeit" bei Kühen verwenden. Auch für die Milchkontrolle liefert sie hinsichtlich der abgelaufenen Mastitiden unzweifelhafte Anhaltspunkte.

13. Andere Euterkrankheiten, wie Abcesse in der Milchdrüse, Nekrose derselben, Eutertuberkulose, Euterpocken und Euterfurunkulose sowie Milchfehler lassen ebenfalls einen höheren Katalasegehalt nachweisen.

14. Auch andere (nicht Euter-) Krankheiten, insbesondere Peritonitis und Tuberkulose (ohne Euteraffektion) ergaben auf allen vier Strichen ebenfalls eine bedeutend höhere Katalasezahl, die bei Peritonitis nur während der Krankheitsdauer auftritt, bei eintretender Besserung allmählich auf das Normale sinkt, so daß man aus der jeweiligen Katalasemenge auf eine Besserung oder Verschlimmerung des Prozesses schließen kann.

Zum Schlusse möchte ich noch meiner Ansicht über den Wert dieser Ergebnisse für die praktische Milchkontrolle Ausdruck verleihen.

Die Katalasezahl der normalen Milch erscheint mir mit Rücksicht auf die vielfach noch unbekannten Einflüsse auf die Erhöhung dieses Enzyms mit 2,5 ccm zu niedrig angegeben, da eine Vermehrung der Katalase über diese Norm sehr häufig ohne Nachweis eines pathologischen oder physiologischen Momentes auftritt.

Bei Vollmilch, also direkt von einer bestimmten Kuh eines Milchmeiers gewonnener, sowie bei der von sämtlichen Kühen eines Besitzers stammenden Milch läßt sich durch Untersuchung derselben von jeder einzelnen Kuh und deren Vierteln das fragliche Tier wohl ermitteln.

Bei Mischmilch, insbesondere in Großstädten, wo der einzelne Verschleißer häufig die Milch von Zwischenhändlern und dieser wieder von verschiedenen Meiereien, Meierhöfen und Milchgenossenschaften teils in der Stadt, teils auf dem Lande bezieht, ist unter den dermaligen Verhältnissen die Sicherstellung einer Kuh, die katalasereiche Milch liefert, wohl sehr schwer, wenn nicht ganz unmöglich.

Andrerseits ist zu berücksichtigen, daß die höhere Katalasemenge einer einzigen und selbst einiger Kühe durch die Vermischung mit einem großen Quantum normaler Milch sich derart ausgleichen wird, daß kaum eine höhere Katalasezahl sich ergeben dürfte. Eine diesbezügliche wirksame Kontrolle wäre nur denkbar, wenn die Milch jedes einzelnen Besitzers in einer gekennzeichneten Kanne in den Handel käme und das Durcheinandermischen der Milch aus verschiedenen Milchkannen verboten, andrerseits der Milchverschleißer angehalten würde, über die Provenienz jeder Milch Auskunft geben zu können. In Molkereien wäre selbstverständlich die Milch jeder Kanne vor der weiteren Verarbeitung einer Untersuchung zu unterziehen. Die Abnahme und Untersuchung der einzelnen Milchproben erfordert jedenfalls mehrere Stunden, so daß also das Ergebnis der Enzymprobe für den Verkauf der betreffenden Milch an diesem Tage nicht mehr in Frage käme, sondern nur zur Eruierung der fraglichen Kuh dienen könnte. Erst am nächsten oder den folgenden Tagen, wenn dieselbe Milch vom selben Viehbesitzer das gleiche Resultat liefern würde, sollte man dann mit der Saisierung, beziehungsweise Konfiskation derselben vorgehen.

Die zweckentsprechendste Kontrolle in dieser und auch in milchhygienischer Richtung könnte allerdings nur in dem Stalle des Viehbesitzers vorgenommen werden, was derzeit regelmäßig wohl nicht, höchstens probeweise möglich ist.

Über die Verteilung des Extraktivstickstoffes im Säugetiermuskel.

Von

Otto von Fürth und Carl Schwarz (Wien).

(Eingegangen am 27. Dezember 1910.)

Unsere Kenntnisse in bezug auf die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe des Muskelgewebes haben im Verlaufe der letzten Jahre namentlich durch die Untersuchungen von Gulewitsch und Krimberg sowie von Kutscher eine weitgehende Bereicherung erfahren.[1]) Es hat sich ergeben, daß sich neben den altbekannten Extraktivstoffen, wie dem Kreatin, dem Kreatinin und den Purinkörpern, in Muskelextrakten noch eine ganze Reihe von früher unbekannten basischen Bestandteilen finden: so das Carnosin (Ignotin), Carnitin, Methylguanidin, Novain, Oblitin, Neosin, Vitiatin. Die relativ reichliche Ausbeute, die zum mindesten in bezug auf die erstgenannten erzielt worden ist, erhöht das physiologische Interesse dieser neuentdeckten Substanzen.

Selbstverständlicherweise ist eine Aufklärung der biologischen Rolle und Bedeutung dieser Muskelbestandteile nur von der Untersuchung ihrer quantitativen Relation unter wechselnden physiologischen Bedingungen zu erwarten. Als ein erster Schritt auf diesem Wege wurde die vorliegende Untersuchung über die Verteilung des Extraktivstickstoffes im Säugetiermuskel auf gewisse Fraktionen in Angriff genommen. Wir hielten eine solche Stickstoff-Fraktionierung zur Erzielung einer allgemeinen Orientierung für um so erwünschter, als eine

[1]) Vgl. die Literaturangaben in dem Artikel von O. v. Fürth über Chemie des Muskelgewebes im Handb. d. Biochemie, herausgegeben von Oppenheimer, 2., 2. Teil, 271 bis 278, 1908.

Durchsicht der einschlägigen Literatur uns darüber belehrt hatte, daß zwar eine größere Reihe von Einzelbestimmungen über die Menge der Purinkörper, des Kreatins und des Kreatinins, des Ammoniaks, des Harnstoffs und des „Nucleons" vorliegen, ferner einige einfache Versuche zur Aufteilung des Stickstoffes auf Basen, Albumosen usw., daß aber eine systematische Untersuchung der Mengenverhältnisse der einzelnen Hauptbestandteile unter Berücksichtigung der neuentdeckten Extraktivstoffe bisher aussteht.

Erst nachdem die vorliegende Untersuchung nahezu abgeschlossen war, gelangte eine dem gleichen Ziele zustrebende Untersuchung aus dem Laboratorium von Gulewitsch[1]) zu unserer Kenntnis und wir konnten einige dabei gewonnene Zahlen zum Vergleiche mit unseren Resultaten heranziehen. Eine andere neuere Untersuchung von Susuki und Joshimura[2]) bezieht sich ausschließlich auf die gänzlich abweichenden Verhältnisse der Fischmuskulatur, kommt daher hier nicht in Betracht.

Wie sehr es an systematischen Untersuchungen über die quantitative Zusammensetzung der Muskelsubstanz mangelt, geht vielleicht am besten aus der Tatsache hervor, daß Hammarsten in seinem vortrefflichen Lehrbuche eine diesen Gegenstand betreffende Übersichtstabelle anführt, die der im Jahre 1876 erschienenen Zoochemie von K. B. Hofmann entnommen ist, wobei er allerdings die Bemerkung hinzufügt, daß dieselbe den gegenwärtigen Anforderungen nicht mehr entspricht.

Es sei uns zunächst gestattet, den Plan und die Methodik unserer Versuche kurz zu skizzieren.

Unsere Untersuchung umfaßt 6 Versuchsreihen, von denen je zwei die Skelett- bzw. Herzmuskulatur des Pferdes und die Skelettmuskulatur des Hundes betreffen.

Die beiden letztgenannten Versuchsreihen hängen unmittelbar zusammen, insofern sie von demselben Individuum her-

[1]) Wl. Skworzow, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. Eine vergleichende Untersuchung der N-haltigen Bestandteile des Kalb- und Rindfleisches. (Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Moskau.) Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 1, S. 26. Ausgeg. am 31. August 1910.

[2]) U. Susuki und K. Joshimura, Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches. Zeitschr. f. physiol. Chemie 62, 1, 1909.

rühren, einem großen Hunde, und zwar wurde die Muskulatur der einen Hinterextremität desselben in normalem Zustande, die der anderen nach Ermüdung durch langdauernde tetanische Reizung untersucht.

Die von anhaftendem Fett- und Bindegewebe nach Möglichkeit befreite und sorgfältig zerkleinerte frische Muskelsubstanz wurde abgewogen und 3 mal mit destilliertem Wasser ausgekocht. In aliquoten Teilen des Extraktes wurde der Gesamtstickstoff ermittelt.

Es erfolgte nunmehr die Aufteilung des Gesamtstickstoffes auf folgende Fraktionen: Gesamtheit der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen; kolloide Substanzen von albumoseartigem Charakter; Ammoniak; Purinkörper; Kreatin und Kreatinin; Carnosinfraktion: Basenrest (das Carnitin, Methylguanidin und andere basische Substanzen umfassend); Aminosäuren; Polypeptide und Harnstoff.

Die Details des eingeschlagenen Verfahrens sind der Beschreibung der einzelnen Versuche zu entnehmen. Es dürfte an dieser Stelle genügen, das Prinzip, das den einzelnen Methoden zugrunde lag, in Kürze anzudeuten.

Da Vorversuche uns darüber belehrt hatten, wie schwierig es ist, beim Auswaschen und Zerlegen voluminöser Niederschläge Verluste zu vermeiden, haben wir, soweit sich dies umgehen ließ, davon Abstand genommen, mehrere Bestimmungen hintereinander zu reihen; wir haben dieselben vielmehr nach Möglichkeit nebeneinander gefügt und dazu stets neue aliquote Teile des ursprünglichen Muskelextraktes benutzt. Selbstverständlicherweise setzt diese Arbeitsweise das Vorhandensein reichlicher Mengen des Ausgangsmaterials voraus und haben wir meist Mengen von 3 bis 5 kg Fleisch in Arbeit genommen; (nur bei den Hunde-Versuchen mußten wir uns notgedrungen mit Mengen von je 1 kg begnügen).

Was zunächst die Bestimmung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffes betrifft, wurde dieselbe unter Verwertung der von König und Böhmer[1]) gewonnenen Erfahrungen durchgeführt, wobei (um eine vollständige Fällung zu erzielen) auf ein

[1]) König und Böhmer, Zeitschr. f. anal. Chem. 34, 548, 1895.

mindestens 1wöchentliches Stehen der mit dem Reagens versetzten Proben Wert gelegt wurde.

Zur Ermittelung des N der Albumosen-Fraktion (oder richtiger ausgedrückt, der Fraktion der kolloidalen, aussalzbaren Eiweißderivate) wurde das Verfahren der Aussalzung mit Zinksulfat nach Baumann und Böhmer[1]) benutzt.

Nebenbei bemerkt, haben wir unsere ursprüngliche Absicht, das „Nucleon" gesondert zu bestimmen, aufgegeben, da es uns einigemal mißlungen war, unter genauer Einhaltung des Vorganges von Balke und Ide[2]) in unseren Muskelextrakten eine dem Nucleon entsprechende Fällung zu erzielen.

Die Bestimmung des Ammoniaks erfolgte in üblicher Weise durch Destillation mit Magnesia.

Die Purinkörper wurden nach Beseitigung der durch Bleiacetat fällbaren Substanzen nach dem Verfahren von Krüger und Schmidt[3]) unter Kombination der Silber- und Kupferfällung abgeschieden, und zwar wurde entweder erst mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der abgetrennte Niederschlag mit Salzsäure zerlegt und die neutralisierte Flüssigkeit sodann mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt; oder aber die Kupferfällung wurde vorausgeschickt, der Niederschlag mit Natriumsulfid zerlegt und die Purinbasenfällung schließlich nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffes mit ammoniakalischer Silberlösung vorgenommen. In der letzten Fällung wurde der N nach Kjeldahl bestimmt (wobei natürlich auf völlige Beseitigung des Ammoniaks entsprechend geachtet wurde).

Die Bestimmung des Kreatins und des Kreatinins geschah nach dem Verfahren von Folin[4]) unter Anwendung eines Colorimeters von Dubosq sowie unter Einhaltung der von Pekelharing und Hoogenhuyze[5]) angegebenen Kautelen.

Zur Bestimmung des in der Carnosinfraktion enthaltenen Stickstoffes wurde ein aliquoter Teil des Muskelextrakts unter Anwendung der von Gulewitsch und Krimberg bzw. Kutscher geübten Prinzipien[6]) mit Bleiacetat und das entbleite und neutralisierte Filtrat mit 20%iger Silbernitratlösung gefällt. Die ausgeschiedenen Silberverbindungen der Purinbasen wurden abgetrennt, zum Filtrat

---

[1]) K. Baumann und Böhmer, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1, 106, 1898. — Vgl. auch E. Zuntz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 218, 1899.

[2]) Balke und Ide, Zeitschr. f. physiol. Chem. 21, 381, 1895.

[3]) Vgl. Thierfelder, Handb. d. Analyse, 8. Aufl., 1909, S. 590.

[4]) Vgl. Thierfelders Handb., 8. Aufl., 1909, S. 585.

[5]) Pekelharing und Hoogenhuyze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 264ff., 1910.

[6]) Vgl. Ackermanns Artikel über „Isolierung von Basen aus Extrakten von Muskeln" in Abderhaldens Handb. der biochemischen Arbeitsmethoden 2, 1049, 1910.

weitere Mengen Silbernitratlösung hinzugefügt (bis eine Probe der Flüssigkeit mit Barythydrat gemischt, eine dunkle Fällung gab); schließlich wurde mit Barythydrat ausgefällt und in dem letzten Niederschlage der N nach Kjeldahl ermittelt.

Der N des Basenrestes, also jener Fraktion, die das Carnitin, Methylguanidin und andere in geringeren Mengen im Fleischextrakte auftretende Basen in sich schließt, wurde auf rechnerischem Wege ermittelt, indem von dem durch Phosphorwolframsäure fällbaren N-Werte die Summe aus den N-Werten der Albumosenfraktion, des Ammoniaks, der Purinkörper, des Kreatinins und des Carnosins abgezogen wurde.

Die Bestimmung des Aminosäure-N sowie des peptidgebundenen N erfolgte (nach Beseitigung aller durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen und nach Entfernung dieses Fällungsmittels durch Baryt) durch Formoltitration nach Sörensen-Henriquez[1]), und zwar einerseits direkt, andrerseits nach vorausgegangener Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure.

Endlich wurde der Harnstoff, und zwar gleichfalls im Phosphorwolframsäurefiltrate nach dem Verfahren von Braunstein[2]) bestimmt.

Wir gehen nunmehr zur Beschreibung der einzelnen Versuche über.

I. Versuchsreihe.

Skelettmuskulatur des Pferdes.

5 kg frisches, von anhaftendem Fett und Bindegewebe möglichst befreites Pferdefleisch wurden sorgfältig zerkleinert und 3mal mit Wasser ausgekocht; der Extrakt wurde stark eingeengt, filtriert, auf 2 l aufgefüllt und mit Toluol versetzt. Lösung „A".

1. Gesamt-N. In 2 Portionen von A zu je 5 g bestimmt: a) 0,0504, b) 0,0528, Mittel 0,0516 g N in 5 ccm oder 1,0320 g in 100 ccm A.

Es wurden ferner 3 Portionen des frischen Muskels zu je 20 g genau abgewogen und 3mal mit Wasser ausgekocht. In den Extrakten fanden sich a) 0,4387, b) 0,4184, c) 0,4219, im Mittel 0,4263 g N für 100 g Muskel (= 100% des Extrakt-N).

Aus obigen Werten für den N-Gehalt von A ergibt sich, daß 41,31 ccm von A je 100 g Muskel entsprechen, was der Berechnung zugrunde gelegt wurde.

2. Phosphorwolframsäure-Fällung. 5 bzw. 10 ccm von A wurden mit 20%iger Phosphorwolframsäure (mit einem Gehalt von 4%iger Schwefelsäure) gefällt. Der Niederschlag wurde nach 7tägigem Stehen auf einem Saugfilter gesammelt, mit schwefelsäurehaltiger Phosphorwolframsäure 2% gewaschen und in den (mit einer Schütteleinrichtung ver-

[1]) Vgl. den Artikel von Ellinger in „Analyse des Harnes" (11. Aufl. von Neubauer-Hupperts Lehrbuch) 1910, S. 643 bis 646.

[2]) Braunstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 381, 1901.

sehenen) Kjeldahl-Zersetzungsapparat gebracht. Es fanden sich, auf 100 ccm von A umgerechnet: a) 0,7125, b) 0,7385, Mittel 0,7255 g N, demnach für 100 g Muskel:

0,2988 g N = 70,11% im PWS-Niederschlag
0,1275 g N = 29,89% „ „ -Filtrat
0,4263 g N = 100,—%

3. Ammoniak. 50 ccm von A gaben a) 0,0211, b) 0,0205, Mittel 0,0208 g N. 100 g Muskel: 0,0172 g N (= 4,03% des Extrakt-N).

4. Albumosen. Je 20 ccm von A mit Zinksulfat (garant. rein), nach Baumann und Böhmer gesättigt, der Niederschlag abfiltriert, mit gesättigter Zinksulfatlösung gewaschen; N-Bestimmung: a) 0,02148, b) 0,02120, Mittel 0,02134 g N in 20 ccm von A, d. i. 0,0441 g N für 100 g Muskel (= 10,34% des Extrakt-N).

5. Purinkörper. 50 ccm von A mit Bleiacetat gefällt, Filtrat von Blei befreit, auf 125 ccm aufgefüllt (Lösung „B"). 50 ccm der Lösung B mit Silbernitrat 20% gefällt, der Niederschlag filtriert, gewaschen, mit Salzsäure zerlegt, die Lösung mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid gefällt; der Niederschlag gewaschen und dem Kjeldahlverfahren unterworfen. a) 0,01010, b) 0,01249, Mittel 0,01130 g N. Umgerechnet auf 100 g Muskel (= 41,31 ccm A): 0,0233 g N (= 5,47% des Extrakt-N).

6. Kreatinin. Bestimmung nach Folin (s. o.) ergab für 100 ccm von A bei colorimetrischer Einstellung nach 10facher Verdünnung a) 0,029, b) 0,023, Mittel 0,026 g Kreatinin; demnach in 100 g Muskel (= 41,31 ccm von A) 0,1074 g Kreatinin oder (da Kreatinin 37,17% N enthält) 0,0399 g Kreatinin-N (= 9,36% des Extrakt-N).

7. Kreatin + Kreatinin. Bestimmung nach der von Pekelharing und Hoogenhuyze (s. o.) angegebenen Modifikation des Folinschen Verfahrens. Colorimetrische Bestimmung bei 10facher Verdünnung. In 10 ccm von A fand sich nach vollzogener Salzsäure-Hydrolyse a) 0,064, b) 0,068, Mittel 0,066 g; in 100 g Muskel (= 41,31 ccm N) demnach 0,2726 g Kreatinin. Dies entspricht 0,1013 g N (= 23,77% des Extrakt-N).

8. N der Carnosinfraktion. 50 ccm von A mit neutralem Bleiacetat gefällt, Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, mit 20%igem Silbernitrat gefällt, filtriert, Filtrat mit Silbernitrat und Baryt ausgefällt (s. o.). 100 g Muskeln entsprechend gefunden 0,1159 g N (= 27,19% des Extrakt-N).

9. N des Basenrestes.

Albumosen-N	0,0441	10,34%
Ammoniak-N	0,0172	4,03 „
Purin-N	0,0233	5,47 „
Kreatinin-N	0,0399	9,36 „
Carnosin-N	0,1159	27,19 „
	0,2404	56,39%
Basenrest-N	0,0584	13,72 „
Gesamt-N der PWS-Fällung	0,2988	70,11%

10. Fraktionierung des Phosphorwolframsäurefiltrates. 200 ccm von A wurden mit einem Überschusse von Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat mit Baryt von PWS, mit Kohlensäure von Baryt befreit, auf 500 ccm aufgefüllt. Vorgang nicht quantitativ („Lösung B").

α) Gesamt-N: 20 ccm B a) 0,0113, b) 0,0123, Mittel 0,0188 g N, 100 g B demnach 0,0590 g N.

β) Aminosäure-N. Formoltitration nach Henriquez und Sörensen (s. o.). 40 ccm der Lösung B (neutral gegen Lackmus) ergaben, gegen Phenolphthalein titriert, eine Acidität von 0,4 ccm $^n/_{10}$-Säure. Nach Zusatz von 10 ccm Formol (genau gegen Phenolphthalein neutralisierte 40%ige Lösung) ergab sich eine Aciditätszunahme entsprechend 2,9 ccm $^n/_{10}$-Säure. Demnach $2{,}9 \times 0{,}0014 = 0{,}0041$ g Aminosäuren-N in 40 ccm der Lösung B und 0,0103 g Aminosäuren-N in 100 ccm von B. Zur Umrechnung auf 100 g Muskel wurde der früher für den N des Phosphorwolframsäurefiltrates (siehe S. 418) ermittelte Wert 0,1275 und der praktisch ermittelte Gesamt-N-Wert der Lösung B (0,0590) herangezogen:

$$x : 0{,}0103 = 0{,}1275 : 0{,}0590$$
$$x = 0{,}0233,$$

demnach für 100 g Muskeln: 0,0233 g Aminosäuren-N = 5,22% des Extrakt-N.

γ) Polypeptid-N. 40 ccm der Lösung B mit 40 ccm konzentrierter Salzsäure in einem Rundkolben unter Rückflußkühlung auf dem Sandbade $1^1/_2$ Stunde lebhaft gekocht, dann in eine Schale überspült und auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Der aus Krystallnadeln bestehende Rückstand wurde in Wasser gelöst, die Lösung vorsichtig gegen Lackmus neutralisiert, dann gegen Phenolphthalein titriert, mit 10 ccm (gegen Phenolphthalein neutraler) 40%iger Formollösung versetzt und wieder titriert. Die Aciditätszunahme betrug 4,2 ccm $^n/_{10}$-Säure, d. i. $4{,}2 \times 0{,}0014 = 0{,}0058$ g N in 40 ccm der Lösung B und 0,0145 g in 100 ccm der Lösung B. Demnach beträgt für 100 ccm letzterer Lösung die Summe

Aminosäure-N + Polypeptid-N . . .	0,0145 g
Aminosäuren-N (s. o.)	0,0103 g
Polypeptid-N	0,0042 g

für 100 g Muskeln umgerechnet aus

$$x : 0{,}0042 = 0{,}1275 : 0{,}0590$$

$x = 0{,}0091$ Polypeptid-N in 100 g Muskel (= 2,13% des Extrakt-N).

δ) Harnstoff-N. 20 ccm von B mit 10 g glasiger Phosphorsäure zur Trockne gebracht, dann 5 Stunden auf 150° erhitzt, in viel Wasser gelöst und mit 10 g Magnesia destilliert: 0,0028 g N in 20 ccm B, demnach 0,0140 g N in 100 ccm von B, woraus sich bei Umrechnung wie oben ergibt: für 100 g Muskel 0,0302 g Harnstoff-N (= 7,10% des Extrakt-N).

Resultat:

	In 100 g Muskel g N	% des Extrakt-N
Albumosen	0,0441	10,34
Ammoniak	0,0172	4,03
Purinkörper	0,0233	5,47
Kreatin + Kreatinin	0,1013	23,77
Carnosinfraktion	0,1159	27,19
Basen-Restfraktion	0,0584	13,72
Aminosäuren	0,0223	5,22
Polypeptide	0,0091	2,13
Harnstoff	0,0302	7,10
Rest	0,0045	1,03
	0,4263	100,—

II. Versuchsreihe.

Skelettmuskulatur des Pferdes.

3330 g frisches Pferdefleisch, von anhaftenden Sehnen und von Fettgewebe sorgfältig befreit, wurden zerkleinert und unter möglichster Vermeidung von Verlusten 3 mal mit Wasser ausgekocht. Extrakt auf 1332 ccm aufgefüllt (Lösung „A"), derart, daß 100 g Muskel 40 ccm von A entsprechen.

1. Gesamt-N. 10 ccm A: a) 0,09856, b) 0,09954, Mittel 0,09905 g N, demnach 100 g Muskel: 0,3962 g Gesamt-N (= 100% des Extrakt-N).

2. Ammoniak. 50 ccm A: a) 0,02836, b) 0,02906, Mittel 0,02871 g Ammoniak-N. 100 g Muskel (= 40 ccm A), demnach 0,02297 g Ammoniak-N (= 5,80 des Extrakt-N.)

3. Purinkörper (nach Krüger und Schmidt s. o.),

α) 20 ccm A, erst Kupferfällung, dann Silberfällung: { 0,01755 / 0,01896 / 0,01728 } Mittel 0,01793;

in 100 g Muskeln (= 40 ccm A) 0,03586 g Purin-N.

β) 200 ccm A mit Bleiacetat gefällt, Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, auf 500 ccm eingeengt („Lösung B").

100 ccm von B (entsprechend 40 ccm A oder 100 g Muskel) mit 20%igem Silbernitrat gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zerlegt, das Filtrat neutralisiert, mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt:

in 100 g Muskel 0,03694 g Purin-N.

α) . . . 0,03586 } Mittel 0,0364 g Purin-N in 100 g
β) . . . 0,03694 } Muskel (= 9,18% des Extrakt-N)

4. Albumosen (nach Baumann und Böhmer, s. o.). 20 ccm A: a) 0,03594, b) 0,03313, Mittel 0,03453 g N; demnach in 100 g Muskel 0,06906 Albumosen-N (= 17,43% des Extrakt-N).

5. Phosphorwolframsäure-Fällung (nach 11tägigem Stehen filtriert). 10 ccm A: a) 0,08283, b) 0,08354, Mittel 0,08318; demnach in 100 g Muskel 0,3327 Basen-N (= 83,95% des Extrakt-N).

6. Kreatinin. Bestimmung nach Folin im Dubosq-Colorimeter nach 10facher Verdünnung. 10 ccm A enthalten 0,0485 g Kreatinin, 100 g Muskel demnach 0,1940 g Kreatinin oder 0,0721 g Kreatinin-N (= 18,20% des Extrakt-N).

7. Kreatin + Kreatinin. 10 ccm von A 10fach verdünnt; davon 10 ccm mit 20 ccm normaler Salzsäure $^1/_2$ Stunde im Autoklaven auf 115 bis 120° erhitzt; sodann Bestimmung nach Folin. 10 ccm A enthalten nunmehr 0,0818 Kreatinin; 100 g Muskel demnach nach vollzogener Hydrolyse 0,3272 g Kreatinin oder 0,1216 Kreatinin-N (= 30,69 des Extrakt-N).

8. N der Carnosinfraktion.

α) Aus 200 ccm von A Carnosinfraktion, nach (wie auf S. 416 beschrieben) vorausgegangener Bleiacetat- und Silberfällung mit Silber und Baryt gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Lösung derart eingeengt, daß 100 ccm derselben 100 g Muskel entsprachen.

In je 10 ccm dieser Lösung wurde N bestimmt: $\left\{\begin{matrix}0{,}01193\\0{,}01123\end{matrix}\right\}$ Mittel 0,01158 g N, in 100 ccm demnach 0,1158 g N.

In weiteren 50 ccm der Lösung wurde der darin enthaltene Ammoniak bestimmt: 0,0028 g N.

100 g Muskel enthalten demnach $0{,}1158 - 2 \times 0{,}0028 = 0{,}1102$ Carnosin-N.

β) Analoger Versuch unter Verarbeitung von 100 ccm von A ergab für 100 g Muskel 0,1002 g Carnosin-N, also

Mittel $\left\{\begin{matrix}0{,}1102\\0{,}1002\end{matrix}\right\}$ 0,1052 g Carnosin-N (= 26,55% des Extrakt-N).

9. Phosphorwolframsäure-Filtrat. 200 ccm von A mit einem Überschusse von Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat mit Baryt von Phosphorwolframsäure, mit Kohlensäure vom Barytüberschusse befreit, eingeengt, filtriert, auf 200 ccm aufgefüllt (Lösung „B"). Die ganze Prozedur unter möglichster Vermeidung von Verlusten durchgeführt.

α) Aminosäuren: Je 20 ccm B mit Phenolphthalein versetzt, die schwach alkalische Lösung durch Zusatz von 0,3 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 neutralisiert. Nunmehr 10 ccm einer genau gegen Phenolphthalein neutralisierten 40%igen Formollösung hinzugefügt. Aciditätszunahme $\left\{\begin{matrix}2{,}7\\2{,}8\end{matrix}\right\}$ 2,75 ccm $^n/_{10}$-Säure. In 100 g Muskel (= 40 ccm A), demnach $5{,}5 \times 0{,}0014 = 0{,}0077$ g Aminosäuren-N (= 1,94% des Extrakt-N).

β) Polypeptide. Je 20 ccm B mit 20 ccm konzentrierter Salzsäure 2 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht, sodann in eine Schale übergespült und zur Trockne gedampft. Der krystallinische Rückstand

in Wasser gelöst, mit Phenolphthalein versetzt, neutralisiert und mit Formol titriert. Aciditätszunahme $\left.\begin{matrix}3{,}3\\4{,}0\end{matrix}\right\}$ 3,65 ccm $^n/_{10}$-Säure; für 100 g Muskel demnach $7{,}3 \times 0{,}0014 = 0{,}0102$ N.

Aminosäure-N + Polypeptid-N . .	0,0102
Aminosäuren-N (s. o.)	0,0077
Polypeptid-N	0,0025 g N in 100 g Muskel (= 0,63% des Extrakt-N).

γ) Harnstoff (nach Braunstein). In 20 ccm B: $\left.\begin{matrix}1{,}6\\1{,}2\end{matrix}\right\}$ 1,4 ccm $^n/_{10}$-NH_3; 100 g Muskel: 2,8 ccm $^n/_{10}$-N = 0,0039 g Harnstoff-N (= 0,98% des Extrakt-N).

10. Basenrest.

Ammoniak-N	0,02297	5,80%
Purinkörper-N	0,0364	9,18 „
Albumosen-N	0,06906	17,43 „
Kreatinin-N	0,0721	18,20 „
Carnosin-N	0,1052	26,55 „
	0,3057	77,16%
Basenrest-N	0,0270	6,79 „
Phosphorwolframsäure- (fällbare) N .	0,3327	83,95%

Resultat:

	In 100 g Muskel g N	% des Extrakt-N
Albumosen	0,0690	17,43
Ammoniak	0,0229	5,80
Purinkörper	0,0364	9,18
Kreatin + Kreatinin . . .	0,1216	30,69
Carnosinfraktion	0,1052	26,55
Basen-Restfraktion . . .	0,0270	6,80
Aminosäuren	0,0077	1,94
Polypeptide	0,0025	0,63
Harnstoff	0,0039	0,98
	0,3962	100,—

III. Versuchsreihe.

Skelettmuskulatur des Hundes.

Großer Hund, mit Äther und Chloroform narkotisiert. Durch am Nervus ischiadicus und cruralis angelegte Elektroden wird die Muskulatur der hinteren rechten Extremität im Verlaufe von 1 Stunde 35 Minuten im maximalen Tetanus gehalten.

Nach Ablauf dieser Zeit macht sich Ermüdung bemerkbar. Nunmehr wird das Tier durch Verbluten getötet. Die symmetrischen Muskeln der beiden hinteren Extremitäten wurden abpräpariert und ganz parallel verarbeitet.

Normal.	Ermüdet.
1085 g Muskeln zerkleinert, 3mal mit Wasser ausgekocht; Extrakt auf das Volumen von 434 ccm gebracht, derart, daß 40 ccm des Extraktes 100 g Muskeln entsprechen.	1030 g Muskeln zerkleinert, 3 mal mit Wasser ausgekocht; Extrakt auf das Volumen von 412 ccm gebracht, derart, daß 40 ccm des Extraktes 100 g Muskeln entsprechen.
„Lösung A."	„Lösung A'."

1. Gesamt-N.

10 ccm A: $\left.\begin{matrix}0{,}09814\\0{,}09617\end{matrix}\right\}$ 0,09715 g N	10 ccm A': $\left.\begin{matrix}0{,}09449\\0{,}09546\end{matrix}\right\}$ 0,09497 g N
100 g Muskel: 0,38860 g N (= 100% des Extrakt-N)	100 g Muskel: 0,3799 g N (= 100% des Extrakt-N)

2. Phosphorwolframsäure-Fällung.
(Nach 6 Tagen filtriert.)

10 ccm A: 0,0768 g N	10 ccm A': $\left.\begin{matrix}0{,}07468\\0{,}07588\end{matrix}\right\}$ 0,07528 g N
100 g Muskel: 0,3072 g N (= 79,06% des Extrakt-N)	100 g Muskel: 0,3011 g N (= 79,26% des Extrakt-N)

3. Kreatinin.
Bestimmung nach Folin bei 10facher Verdünnung.

10 ccm A: $\left.\begin{matrix}0{,}0334\\0{,}0371\end{matrix}\right\}$ 0,0352 g Kreatinin	10 ccm A': 0,0330 g Kreatinin
100 g Muskel: 0,1408 g Kreatinin, i. e. 0,0523 g Kreatinin-N (= 13,46% des Extrakt-N)	100 g Muskel: 0,1320 g Kreatinin, i. e. 0,0491 g Kreatinin-N (= 12,92% des Extrakt-N)

4. Kreatin + Kreatinin.
Bestimmung wie in der 1. Versuchsreihe (10fache Verdünnung und Salzsäurehydrolyse).

10 ccm A: 0,0723 g Kreatinin	10 ccm A': 0,0723 g Kreatinin
100 g Muskeln: 0,2892 g Kreatinin = 0,1075 g Kreatinin-N (= 27,66% des Extrakt-N)	100 g Muskel: 0,2892 g Kreatinin = 0,1075 g Kreatinin-N (= 28,30% des Extrakt-N)

5. Ammoniak.

20 ccm A: 0,00897 g Ammoniak-N
100 g Muskel: 0,01794 g Ammoniak (= 4,72% des Extrakt-N)

6. Purinkörper.

Bestimmung nach Krüger und Schmidt in 50 ccm von A bzw. A'. Die Purinkörper werden erst als Silber-, dann als Kupferverbindungen gefällt.

100 g Muskel: 0,0274 g Purin-N (= 7,01% des Extrakt-N)

100 g Muskel: 0,02344 g Purin-N (= 6,17% des Extrakt-N)

7. Carnosinfraktion.

Bestimmung wie in der 1. Versuchsreihe.

100 g Muskel: 0,10856 g Carnosin-N (= 27,95% des Extrakt-N)

100 g Muskel: 0,1168 g Carnosin-N (= 30,74% des Extrakt-N)

8. Albumosen.

20 ccm A: 0,0258 g N

20 ccm A': 0,02892 / 0,02948 } 0,02920 g

100 g Muskel: 0,0516 g Albumosen-N (= 13,28% des Extrakt-N)

100 g Muskel: 0,0584 g Albumosen-N (= 15,37% des Extrakt-N)

9. Basenrest-Fraktion.

Albumosen . .	0,0516	13,28%	Albumosen . .	0,0584	15,37%
Ammoniak . .	(0,0179)	(4,72)„	Ammoniak . .	0,0179	4,72 „
Purinkörper .	0,0274	7,01 „	Purinkörper .	0,0234	6,17 „
Kreatinin . .	0,0523	13,46 „	Kreatinin . .	0,0491	12,91 „
Carnosin . . .	0,1086	27,95 „	Carnosin . . .	0,1168	30,74 „
	0,2578	66,42%		0,2656	69,92%
Basenrest . .	0,0494	12,64 „	Basenrest . .	0,0355	9,34 „
Summe des durch PWS fällbaren N . . .	0,3072	79,06%		0,3011	79,26%

Resultat.

	Normale Muskeln: In 100 g Muskel g N	Normale Muskeln: % des Extrakt-N	Ermüdete Muskeln: In 100 g Muskel g N	Ermüdete Muskeln: % des Extrakt-N
Albumosen . . .	0,0516	13,28	0,0584	15,37
Ammoniak . . .	(0,0179)	(4,72)	0,0179	4,72
Purinkörper . . .	0,0274	7,01	0,0234	6,17
Kreatin + Kreatinin	0,1075	27,66	0,1075	28,30
Carnosin	0,1086	27,95	0,1168	30,74
Basenrest	0,0494	12,64	0,0355	9,34
Aminosäure, Polypeptide, Harnstoff .	0,0262	6,74	0,0204	5,36
	0,3886	100,—	0,3799	100,—

IV. Versuchsreihe.

Pferdeherz.

3340 g ganz frisches Pferdeherz (Ventrikelmuskulatur) zerkleinert, 3 mal mit Wasser ausgekocht, Extrakt eingeengt, filtriert, auf 1 l aufgefüllt („Lösung A"). 100 g Muskel entsprechend 30 ccm der Lösung A.

1. Gesamt-N. In 10 ccm von A $\left\{\begin{matrix}0{,}09884\\0{,}09649\\0{,}09849\end{matrix}\right\}$ 0,09794 g N; in 100 g Muskel (= 30 ccm A) 0,2938 g Gesamt-N (= 100% des Extrakt-N).

2. Albumosen. In 20 ccm von A $\left\{\begin{matrix}0{,}04268\\0{,}04314\\0{,}04118\end{matrix}\right\}$ 0,0433 g N; in 100 g Muskel 0,06350 g Albumosen-N (= 21,62% des Extrakt-N).

3. Phosphorwolframsäure-Fällung. In 10 ccm von A $\left\{\begin{matrix}0{,}07722\\0{,}07764\end{matrix}\right\}$ 0,07743 g N; in 100 g Muskel 0,2322 g Basen-N (= 79,07% des Extrakt-N).

4. Purinkörper (nach Krüger und Schmidt).

α) Purinkörper als Kupferverbindungen gefällt, Niederschlag zerlegt, sodann Fällung mit ammoniakalischem Silber: in 30 ccm A, entsprechend 100 g Muskel 0,0358 g Purin-N.

β) Ebenso, jedoch nach vorausgegangener Hydrolyse durch Kochen mit verdünnter Salzsäure: in 30 ccm A (= 100 g Muskel) $\left\{\begin{matrix}0{,}03594\\0{,}03509\end{matrix}\right\}$ 0,03556 g Purin-N.

γ) 50 ccm A mit Bleiacetat gefällt, entbleites Filtrat auf 100 ccm aufgefüllt („Lösung B"). 50 ccm von B (entsprechend 50 g Muskel) mit 20%igem Silbernitrat gefällt, der Niederschlag zerlegt; die Flüssigkeit mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt, der N-Gehalt des Niederschlages bestimmt: 0,01628 g N. In 100 g Muskel demnach 0,03256 g N.

In 100 g Muskel $\left\{\begin{matrix}0{,}0358\\0{,}0356\\0{,}0326\end{matrix}\right\}$ 0,0347 g N (= 11,81% des Extrakt-N).

5. Ammoniak. 50 ccm A $\left\{\begin{matrix}0{,}04352\\0{,}04310\end{matrix}\right\}$ 0,04331 g N; in 100 g Muskel: 0,02599 g Ammoniak-N (= 8,85% des Extrakt-N).

6. Carnosin-Fraktion. Je 30 g wie in I. Versuchsreihe verarbeitet; in 100 g Muskel $\left\{\begin{matrix}0{,}0837\\0{,}08905\end{matrix}\right\}$ 0,0864 g N (= 29,41% des Extrakt-N).

7. Kreatinin. (Bestimmung nach Folin bei 10facher Verdünnung.) Für 100 g Muskel: 0,1161 g Kreatinin = 0,0432 g N (= 14,70% des Extrakt-N).

8. Kreatin. Bestimmung nach Pekelharing und Hoogenhuyze):

100 g Muskel 0,1959 g Kreatin + Kreatinin
0,1161 g Kreatinin
0,0798 g Kreatin = 0,0297 g N (= 10,10% des Extrakt-N).

9. Restfraktion.

Albumosen . . .	0,06350	21,62%
Purine	0,03470	11,81 „
Ammoniak . . .	0,02599	8,85 „
Carnosin	0,0864	29,41 „
Kreatinin . . .	0,0432	14,70 „
	0,25379	86,39%
Rest	0,04001	13,61 „
	0,2938	100,—%

Resultat:

	In 100 g Muskel g N	% des Extrakt-N
Albumosen	0,0635	21,62
Ammoniak	0,0260	8,85
Purinkörper	0,0347	11,81
Carnosin	0,0864	29,41
Kreatinin	0,0432	14,70
Kreatin	0,0297	10,10
Rest	0,0103	3,51
	0,2938	100,—

V. Versuchsreihe.

Pferdeherz.

3785 g frisches Pferdeherz, 3 mal mit Wasser ausgekocht, auf 1514 ccm aufgefüllt: „Lösung A", 40 ccm A entspricht 100 g Muskel.

1. Gesamt-N. 10 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}07315\\0{,}07385\end{matrix}\right\}$ 0,0735 g N. In 100 g Muskel: 0,2940 g N (= 100% des Extrakt-N).

2. Albumosen. 20 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}0233\\0{,}0247\end{matrix}\right\}$ 0,0240 g N. In 100 g Muskel: 0,0480 g N (= 16,33% des Extrakt-N).

3. Ammoniak. 50 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}03018\\0{,}02892\end{matrix}\right\}$ 0,02955. In 100 g Muskel: 0,02364 g N (= 8,04% des Extrakt-N).

4. Carnosin-Fraktion. 20 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}0524\\0{,}0564\end{matrix}\right\}$ 0,0544 g N. In 100 g Muskel: 0,1088 g N (= 37,01% des Extrakt-N).

5. Purin-N (nach Krüger und Schittenhelm). Erst Kupfer-, dann Silberfällung. 20 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}01613\\0{,}01544\end{matrix}\right\}$ 0,01578. In 100 g Muskeln 0,03157 g N (= 10,74% des Extrakt-N).

6. Kreatinin. Bestimmung nach Folin bei 10facher Verdünnung. 10 ccm A: 0,0365 g Kreatinin bzw. 0,01357 g N. In 100 g Muskel: 0,0542 g Kreatinin-N (18,46% des Extrakt-N).

7. Kreatin + Kreatinin. 10 ccm A, 10fach verdünnt, mit 20 ccm normalem HCl $^1/_2$ Stunde auf 115 bis 130° erhitzt. In 100 g Muskel 0,2092 g Kreatinin = 0,0778 g Kreatinin-N (26,45% des Extrakt-N).

8. Phosphorwolframsäure-Fällung, nach 10tägigem Stehen verarbeitet. In 10 ccm A $\left.\begin{matrix}0{,}05152\\0{,}05110\end{matrix}\right\}$ 0,05131 g N. In 100 g Muskel: 0,2052 g Basen-N (69,81% des Extrakt-N).

Resultat:

	In 100 g Muskel g N	% des Extrakt-N
Albumosen	0,0480	16,33
Ammoniak	0,0236	8,04
Purinkörper	0,0316	10,74
Kreatin + Kreatinin . . .	0,0778	26,45
Carnosinfraktion	0,1088	37,01
Rest	0,0042	1,43
	0,2940	100,—

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Wollen wir uns nunmehr einen Überblick über die gewonnenen Resultate verschaffen, so müssen wir uns zunächst über die Bedeutung des „Albumosen"-Gehaltes unserer Extrakte klar werden. Eingehende Versuche, die einerseits von Whitfield[1]) unter Halliburtons Leitung, andererseits von dem einen[2]) von uns seinerzeit ausgeführt worden sind, haben ergeben, daß der Muskel keine albumoseartigen Substanzen vorgebildet enthält. In dem unter Vermeidung höherer Temperaturen und sekundärer Spaltungsvorgänge unter ausreichenden Kautelen bereiteten „Muskelplasma" finden sich keine unkoagulablen, eiweißartigen, durch Ammonsulfat aussalzbaren Substanzen. Wir vermögen daher die sehr erheblichen Mengen

[1]) Whitfield, Journ. of Physiol. 16, 487, 1894.

[2]) O. v. Fürth, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 36, 259, 1895.

Tabelle I.

	Pferdefleisch I		Pferdefleisch II		Hundemuskel normal		Hundemuskel gereizt		Pferdeherz I		Pferdeherz II	
	In 100 g Muskel g N	% des ges. N	In 100 g Muskel g N	% des ges. N	In 100 g Muskel g N	% des ges. N	In 100 g Muskel g N	% des ges. N	In 100 g Muskel g N	% des ges. N	In 100 g Muskel g N	% des ges. N
Ammoniak	0,0172	4,50	0,0229	6,99	(0,0179)	(5,31)	0,0179	5,56	0,0260	11,29	0,0236	9,59
Purinkörper	0,0233	6,10	0,0364	11,12	0,0274	8,31	0,0234	7,27	0,0347	15,07	0,0316	12,85
Kreatin + Kreatinin	0,1013	26,50	0,1216	37,17	0,1075	31,90	0,1075	33,44	0,0729	31,66	0,0778	31,63
Carnosin	0,1159	30,30	0,1052	32,15	0,1086	32,23	0,1168	36,33	0,0864	37,52	0,1088	44,22
Basenrestfraktion	0,0584	15,28	0,0270	8,27	0,0494	14,66	0,0355	11,05	—	—	—	—
Aminosäuren	0,0223	5,83	0,0077	2,35	} 0,0262	7,77	0,0204	6,35	} 0,0103	4,46	0,0042	1,71
Polypeptide	0,0091	2,38	0,0025	0,76								
Harnstoff	0,0302	7,90	0,0039	1,19								
Rest	0,0045	1,21	—									
	0,3822	100,00	0,3272	100,00	0,3370	100,00	0,3215	100,00	0,2303	100,00	0,2460	100,00

derartiger Verbindungen, die in jedem durch Auskochen gewonnenen Muskelextrakte angetroffen werden, nicht als präformierte Bestandteile des Muskels und als echte Extraktbestandteile anzuerkennen; wir sind vielmehr der Meinung, daß sie sekundären Spaltungsvorgängen der (namentlich gegen Säureeinwirkung sehr empfindlichen) koagulablen Muskeleiweißkörper ihre Entstehung verdanken.

Wir glauben daher, daß man in die N-Verteilung der Muskelextraktivstoffe einen richtigeren Einblick gewinnt, wenn man, wie es in der nebenstehenden Tabelle geschehen ist, den Albumosen-N auf rechnerischem Wege aus der Betrachtung ausschaltet.

Wir fügen eine weitere Übersichtstabelle hinzu, die die in 100 g feuchten Muskels enthaltene, auf die einzelnen Komponenten entfallende Stickstoffmenge in Gramm angibt, und zwar einerseits die von uns für Skelett- und Herzmuskeln ermittelten Werte,

andererseits aber eine Anzahl damit vergleichbarer Zahlen, die wir den Literaturangaben direkt entnommen oder aber durch entsprechende Umrechnung daraus gewonnen haben.

Tabelle II.

Verteilung des Extraktiv-N im Säugetiermuskel.

Gramm Stickstoff in 100 g feuchten Muskels:

Fürth und Schwarz:			Andere Autoren:
	Skelettmuskul.	Herzmuskel	
Ammoniak:	0,017–0,023	0,024–0,026	Grafe[1]): 0,011–0,014
Purinkörper:	0,023–0,036	0,031–0,035	Kossel[2]): Rind 0,029, Hund 0,032 Offer und Rosenquist[3]): Rind 0,027 bis 0,046
Kreatin + Kreatinin:	0,101–0,121	0,073–0,079	Monari[4]): 0,12 0,16 Melanby[5]): 0,11–0,16 Pekelharing[6]): 0,11–0,18
Carnosin:	0,105–0,117	0,086–0,109	Skworzow[7]): 0,069–0,12 (Ausbeute an reinem Carnosin-N Krimberg: 0,03 Skworzow: 0,044)
Basenrest:	0,027–0,058	—	Skworzow[7]): 0,012–0,037 (Ausb. an reinem Methylguanidin-N 0,013 „ „ „ Carnitin-N 0,002)
Harnstoff: Polypeptide: Aminosäuren:	0,020–0,065	0,004–0,010	Harnstoff: Brunton und Blackie[8]): 0,01–0,03 Schöndorff[9]): 0,04 Gréhaut[10]): 0,02 Fürth und Schwarz: 0,004–0,030
Albumosen:	0,044–0,069	0,048–0,063	König und Böhmer[11]) (Fleischextrakt): Mittel 0,040–0,047
Gesamt-Extraktiv-N:	0,379–0,426	0,294–0,294	König[12]): Rind 0,40, Schwein 0,40, Hammel 0,47 Offer und Rosenquist[3]): Rind 0,42 Adler[13]): Rind 0,46, Kalb 0,37

Gehen wir nun die einzelnen Kategorien durch, so ergibt sich zunächst, daß die von uns für Gesamt-Extraktiv-N, Ammoniak, Purinkörper, Kreatin und Kreatinin,

[1]) Grafe, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 311, 1906. — [2]) Kossel, ibid. 8, 408, 1884. — [3]) Offer und Rosenquist, Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 43, 44, 49. — [4]) Monari, Atti R. Accad. delle Scienze, Torino, 22, 846, 1887. — [5]) Melanby, Journ. of Physiol. 36, 447, 1907. — [6]) Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 266, 272, 1910. — [7]) Skworzow, l. c. — [8]) Brunton und Blackie, Journ. of Physiol. 23, Suppl. 44 bis 45, 1899. — [9]) Schöndorff, Pflügers Archiv 74, 307, 1899. — [10]) Gréhant, Compt. rend. 137, 558, 1903. — [11]) König und Böhmer, l. c. — [12]) König, Nahrungsmittelchemie, 4. Aufl., 1903, S. 33 bis 34. — [13]) Adler, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 8.

Harnstoff und Albumosen ermittelten Werte derselben Größenordnung angehören wie jene Werte, die wir durch Umrechnung der entsprechenden Zahlen anderer Autoren gewonnen haben.

Von besonderer Bedeutung erscheint jedoch die Tatsache, daß dem Stickstoff der Carnosinfraktion in Muskelextrakten durchwegs ein solcher Raum zukommt, daß alle anderen Bestandteile mit Ausnahme des Kreatins (bzw. seines Umwandlungsproduktes, des Kreatinins) im Vergleiche dazu in den Hintergrund treten. 30 bis 44% des (albumosenfrei berechneten) Muskelextraktivstickstoffs entfielen in unseren Analysen auf den Stickstoff der Carnosinfraktion, während sich 26 bis 37% im Kreatin (bzw. Kreatinin) fanden. Die von den älteren Physiologen und Biochemikern vielfach als Hauptbestandteil des Muskelextraktivstickstoffs bezeichneten Purinkörper rücken dabei mit einem Stickstoffgehalte von 6 bis 15% stark in den Hintergrund.

Unsere Befunde erhalten durch diejenigen Skworzows[1]) eine willkommene Ergänzung; es ergibt sich aus den Analysen dieses Autors für die das Carnosin ausschließenden Hauptfraktionen ein N-Gehalt von 0,069 bis 0,12 g für 100 g feuchten Muskels, während unsere analogen Zahlen sich zwischen 0,086 und 0,117 bewegen.

Eine andere Frage aber ist es, was der Stickstoff dieser Fraktion im chemischen Sinne bedeutet und ob er ausschließlich dem Carnosin oder aber einem anderen Muskelbestandteile angehört. Daß diese Fraktion jedenfalls zum großen Teile aus Carnosin besteht, geht aus dem Umstande hervor, daß die in Form des Nitrats gewonnene Ausbeute an reinem Carnosin-N bei nicht quantitativer Verarbeitung bei Krimberg 0,03 g N, bei Skworzow 0,044 g N für 100 g Muskel betrug, was also immerhin einem ansehnlichen Bruchteile der in unseren Carnosinfraktionen enthaltenen Mengen entspricht.

In unseren Versuchen mit Skelettmuskulatur betrug der rechnerisch ermittelte „Basenrest" 8 bis 15% des Extrakt-N. In den beiden Versuchen mit Herzmuskulatur verblieb für diese Fraktion bei der Berechnung kein Rest; doch möchten wir aus dem letzteren Befunde, da er durch ein Zuviel in

[1]) l. c.

irgendeiner der anderen Basenfraktionen vorgetäuscht sein könnte, keine weitgehenden Folgerungen ziehen. Dieser Basenrest schließt das Carnitin, Methylguanidin und sicherlich auch noch andere Basen ein; derselbe bleibt zweifellos seiner Menge nach hinter der Carnosinfraktion weit zurück. Auch sprechen die Ausbeuten Skworzows nicht für ein sehr reichliches Vorkommen einer dieser Basen.

Was weiterhin den Vergleich zwischen Skelett- und Herzmuskulatur in bezug auf das Verhalten des Extraktivstickstoffs betrifft, so ergab sich ein auffallendes Minus in bezug auf die Gesamtmenge desselben (Skelettmuskel 0,37 bis 0,43 g N, Herzmuskel 0,29 g N in 100 g Muskel), die sicherlich zum Teil durch ein Minus an Kreatin bw. Kreatinin (Skelettmuskel 0,10 bis 0,12 g, Herzmuskel 0,07 bis 0,08 g N in 100 g Muskel) bedingt war. Ob das oben erwähnte Zurücktreten der „Basenrestfraktion" in der Herzmuskulatur ein wirkliches oder nur ein scheinbares ist, könnten nur weitere direkte Versuche lehren.

Was endlich den Vergleich zwischen normaler und ermüdeter Muskulatur betrifft, so hat ein Versuch uns darüber hinreichend orientiert, daß eine Arbeitsleistung, die bis zu einer deutlichen Ermüdung geführt hatte, nicht imstande war, die N-Verteilung im Muskel in sehr auffallender Weise zu verschieben. Auch die von Monari[1]) behauptete ausgiebige Zunahme des Kreatinins bzw. der Summe aus diesem und dem Kreatin fand sich nicht vor. Ob kleinere Verschiebungen vorhanden sind, könnten nur zahlreiche Versuche lehren, die außerhalb des Rahmens dieser Untersuchung liegen.

Als das wichtigste Ergebnis unserer Versuche betrachten wir die Feststellung, daß dem Carnosin neben dem Kreatin eine geradezu dominierende Stellung unter den Muskelextraktivstoffen zukommt. Man ist daher sicherlich berechtigt, diese Base als einen Muskelbestandteil anzusprechen, dessen Erforschung in bezug auf seine physiologische Rolle und Bedeutung als ein wichtiges biologisches Problem erscheint. Eine erfolgreiche Inangriffnahme desselben setzt jedoch eine exakte und direkte Carnosinbestimmungsmethode voraus, zu deren Ausarbeitung bereits Versuche im hiesigen physiologischen Institute im Gange sind.

[1]) l. c.

Zusammenfassung.

1. In 100 g feuchter **Extremitätenmuskulatur des Pferdes und Hundes** fanden sich (nach Abrechnung der sekundären Spaltungsvorgängen entstammenden Albumosen) 0,327 bis 0,382 g Extraktiv-N; davon entfielen auf Ammoniak 0,017 bis 0,023 g (4,5 bis 7,0%), Purinkörper 0,023 bis 0,036 g (6,1 bis 11,1%), Kreatin und Kreatinin 0,101 bis 0,12 g (26,5 bis 37,1%), Carnosinfraktion 0,105 bis 0,117 g (30,3 bis 36,3%), Basenrest (Carnitin, Methylguanidin usw.) 0,027 bis 0,058 g (8,2 bis 15,3%), Harnstoff, Polypeptide und Aminosäuren zusammen 0,020 bis 0,065 g (6,3 bis 16,0%).

2. In 100 g feuchter **Herzmuskulatur des Pferdes** fand sich (nach Abrechnung der Albumosen) 0,294 g Extraktiv-N; davon entfielen auf Ammoniak 0,024 bis 0,026 g (9,6 bis 11,3%), Purinkörper 0,031 bis 0,035 g (12,8 bis 15,0%), Kreatin und Kreatinin 0,073 bis 0,079 g (31,6%), Carnosinfraktion 0,086 bis 0,109 g (37,5 bis 44,2%), Aminosäuren, Harnstoff und Polypeptide zusammen 0,004 bis 0,010 (1,7 bis 4,5%). Die Herzmuskulatur erwies sich sonach wesentlich ärmer an Extraktiv-N als die Extremitätenmuskeln, und zwar kam dieses Manko teilweise auf Rechnung eines Minus an Kreatin bzw. Kreatinin.

3. Der Vergleich normaler und ermüdeter Extremitätenmuskulatur eines Hundes bot keinen Anhaltspunkt für die Annahme irgendeiner weitgehenden Verschiebung in der Verteilung des Extraktivstickstoffs bei der Muskelarbeit. Die diesbezüglichen, das Kreatin betreffenden Angaben Monaris wurden nicht bestätigt.

4. Unter den stickstoffhaltigen Extraktivstoffen des Muskels nimmt neben dem Kreatin vor allem das Carnosin eine dominierende Stellung ein. Die genauere Erforschung der biologischen Bedeutung dieser Base erscheint daher als eine dringende Aufgabe der Muskelphysiologie.

Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll.

Von

Julius Stoklasa und Wenzel Zdobnický.

(Aus der chemisch-physiologischen Versuchsstation an der k. k. böhmischen technischen Hochschule in Prag.)

(Eingegangen am 26. Dezember 1910.)

Mit 1 Figur im Text und 1 Tafel.

Seit den bahnbrechenden Entdeckungen von Ingenhousz, der auf die Tätigkeit des Chlorophylls hingewiesen hat, sind bereits 130 Jahre verflossen, und doch ist es bis heute noch ein ungelöstes Problem geblieben, wie die Photosynthese in der lebenden grünen Zelle der autotrophen Pflanzen vor sich geht. Wir können nur das bestätigen, was Lavoisier geahnt hat, daß die Bildung der neuen, lebenden Pflanzenmaterie im wesentlichen nur ein Reduktionsprozeß der Kohlensäure ist.

Schon im Jahre 1861 haben Kolbe und Schmitt[1]) gefunden, daß Kalium, unter einer Glocke der Einwirkung feuchter Kohlensäure ausgesetzt, Kaliumformiat bilde. Diesen hochwichtigen Befund bestätigte der Physiologe Maly[2]) im Jahre 1865 und konstatierte weiter, daß die Bedingungen zur Synthese der Ameisensäure aus Kohlensäure dann gegeben sind, wenn nascierender Wasserstoff auf Kohlensäure, welch letztere sich im Moment der Übertragung befindet, und zwar bei Gegenwart einer kräftigen Base, zur Wirkung kommt.

Royer[3]) gibt an (1870), daß, wenn man in Bunsens oder Groves Kette die Salpetersäure in der Tonzelle durch reines Wasser ersetzt und Kohlensäure durchleitet, Ameisensäure gebildet wird.

---

[1]) Kolbe und Schmitt, Liebigs Annal. 119, 251.

[2]) Maly, Liebigs Annal. 135, 118.

[3]) Royer, Compt. rend. 70, 731.

Brodie[1]) hat einen elektrischen Strom um eine Röhre zirkulieren lassen, durch die Kohlensäure, gemischt mit Wasserstoff, strömte, und auf diese Weise Ameisensäure erhalten, während ein Gemenge von Kohlenoxyd mit Wasserstoff Methangas lieferte. Bald darauf gibt Brodie an,[2]) daß er aus Wasserstoff und Kohlensäure entweder Kohlenoxyd und Methangas, oder unter etwas veränderten Bedingungen auch etwas Formaldehyd erhalten habe. Doch stützt sich der Nachweis des Formaldehyds nur auf die eudiometrische Analyse des Gasgemenges und kann daher wohl nicht als sicher gelten.

Da Kohlensäure der Pflanze nicht allein als in Wasser gelöstes Hydrat, sondern auch in Form gelöster Bicarbonate geboten wird, schien es Ballo[3]) von Interesse zu ermitteln, ob auch in Wasser gelöste Bicarbonate bei Reduktion Ameisensäure liefern können. Er fand, daß dies mit Hilfe von Natriumamalgam gelingt, während er anderseits beobachtete, daß platiniertes Magnesium Kohlensäure nicht zu Ameisensäure zu reduzieren vermag.

Im Jahre 1895 hat Ad. Lieben[4]) hochinteressante Versuche angestellt über die Reduktion der Kohlensäure bei gewöhnlicher Temperatur. Lieben gelangte zu nachstehenden Resultaten:

1. „In Wasser gelöste Kohlensäure wird durch nascierenden Wasserstoff bei gewöhnlicher Temperatur überhaupt nicht reduziert.

2. Bicarbonate von Alkali- oder alkalischen Erdmetallen (nicht von Magnesium), besonders, wenn sie in Entstehung begriffen, d. h. die Bedingungen zu ihrer Bildung gegeben sind, werden durch nascierenden Wasserstoff leicht, und zwar immer zu ameisensaurem Salz reduziert.

3. Jedesmal, wenn in den beschriebenen Versuchen überhaupt Ameisensäure sich gebildet hat, ist ihre Bildung nach 2. erfolgt.

4. Das Licht spielt bei den hier behandelten Reduktionen keinerlei Rolle.

5. Das einzige Reduktionsprodukt ist Ameisensäure."

Während man nach Ad. Liebens Überzeugung annehmen darf, daß Alkalibicarbonat in Ionen gespalten in der Lösung existiert und daß es das Ion —O.CO.OH ist, das durch nascierenden Wasserstoff in das Ion —O.CO.H der Ameisensäure übergeführt wird, ist für in Wasser gelöste Kohlensäure eine Spaltung in Ionen nicht oder doch nur in sehr viel geringerem Ausmaß anzunehmen. — Da kohlensaures Wasser ein sehr schlechter Leiter ist, so dürfte die Kohlensäure ganz vorwiegend als Anhydrid und nicht, wie man häufig annimmt, als H_2CO_3 darin enthalten sein. Die vergleichsweise wenigen Moleküle H_2CO_3, die in die Ionen H und HCO_3 gespalten in der Lösung sich finden, könnten dann zur Bildung sehr kleiner Mengen von Ameisensäure den Anlaß geben.

---

[1]) Brodie, Berl. Ber. 1873, 573.

[2]) Liebigs Ann. 174, 284.

[3]) Ballo, Berl. Ber. 1884, 6.

[4]) Ad. Lieben, Monatsh. f. Chem., Wien, 1895 u. 1897.

Wie bekannt, sind stille Entladungen eine in physikalischer Hinsicht komplizierte Erscheinung, bei der u. a. ultraviolette Strahlen entstehen. Die stillen elektrischen Entladungen müssen wir als Energiequelle betrachten. Erwähnenswert ist hier, daß namentlich Berthelot, Losanitsch und Jovitschitsch, Thénard, Brodie, Maquenne, Normann-Collie und Walter Löb sich mit dem Studium der chemischen Wirkung stiller elektrischer Entladungen beschäftigten und wichtige Versuchsergebnisse publizierten.

Berthelot[1]) erhielt aus 1 Vol. Kohlensäure und 2 Vol. Wasserstoff eine Substanz, die beim Erwärmen Karamelgeruch zeigte und als ein Kohlenhydrat angesprochen wurde:

$$(2H_2 + CO_2)_n = (CH_2O)_n + nH_2O.$$

Losanitsch und Jovitschitsch (Belgrad)[2]) zeigten, daß sich durch dunkle elektrische Entladungen aus Kohlensäure bzw. Kohlenoxyd und Wasserstoff Ameisensäure sowie Glykolaldehyd bilden.

W. Löb[3]) hat folgendes beobachtet:

1. Die Bildung des Formaldehyds aus feuchter Kohlensäure, 2. die Bildung des Glykolaldehyds aus feuchtem Kohlenoxyd, 3. die Bildung des Formaldehyds aus feuchter Kohlensäure und Wasserstoff, 4. die Bildung des Glykolaldehyds aus feuchtem Kohlenoxyd und Wasserstoff.

Schon längere Zeit tragen wir uns mit der Idee, das Problem zu lösen, wie eigentlich die Synthese der Kohlenhydrate in der lebenden Zelle der autotrophen Pflanzen vor sich geht. Wir haben schon in den Jahren 1904, 1906 und 1907 in unseren Arbeiten[4]) darauf hingewiesen, daß dem von uns mit voller Gewißheit konstatierten Wasserstoff, der bei der Degradation der Kohlenhydrate, und zwar durch die Wirkung der aus dem Pflanzenorganismus von uns isolierten glucolytischen Enzyme, als Endprodukt entsteht, in der lebenden chlorophyllhaltigen

---

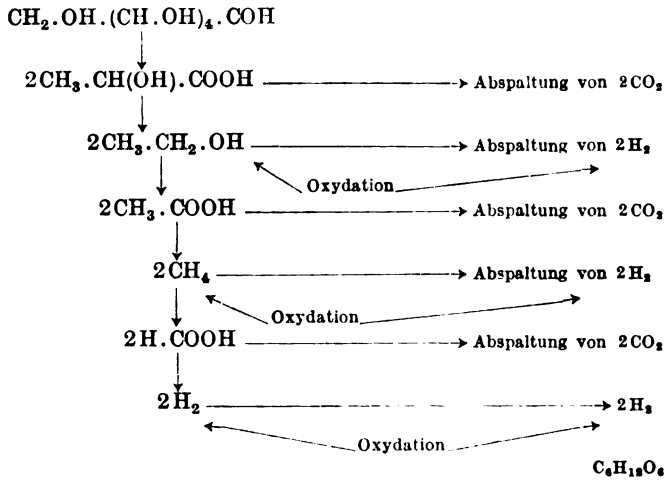
[1]) Berthelot, Essai de Mécanique chimique 2, 377, 1879; Compt. rend. 126, 561, 610, 1898; 131, 772, 1900.

[2]) Losanitsch und Jovitschitsch, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30 (I), 135, 1897.

[3]) Walter Löb, Zeitschr. f. Elektrochem. 1906; Landw. Jahrbücher 1906.

[4]) J. Stoklasa, Fermentation lactique et alcoolique dans les tissus des plantes. Enzymes qui provoquent cette fermentation. Vortrag, gehalten auf dem VI. Internationalen Chemikerkongreß in Rom, 1906, und in Grenoble im Jahre 1904 in der Generalversammlung der L'Association francaise pour l'avancement des sciences. — J. Stoklasa unter Mitwirkung von Adolf Ernest und Karl Chocenský, Über die glykolytischen Enzyme im Pflanzenorganismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, Heft 4 u. 5, 1907.

Zelle eine bedeutungsvolle Funktion bei der Assimilation des Kohlendioxyds zuzuweisen ist. Wir lassen hier im nachstehenden auf Grund unserer Studien ein hypothetisches Schema des Abbaues der Glucose, verursacht durch glucolytische Enzyme, folgen:



Wir haben unter den in dem obigen hypothetischen Schema angeführten Abbauprodukten alle mit Bestimmtheit — bis auf das Methan, dessen Nachweis uns bis jetzt nicht gelungen ist — konstatiert. Heute herrscht bereits kein Zweifel mehr darüber, daß in sämtlichen Zellen, namentlich in den chlorophyllhaltigen Zellen der einzelnen Pflanzenorgane, die von uns isolierten glucolytischen Enzyme vorhanden sind.[1])

Von besonderem Interesse sind die Versuche von C. Neuberg[2]) „Über die chemischen Umwandlungen durch Strahlenarten". Nach seinen Resultaten an Glucose, Fructose, Stärke, Glykogen, Inulin usw. werden die ebenerwähnten Kohlenhydrate durch die Einwirkung von Lichtstrahlen gespalten, d. h. es tritt eine Hydrolyse der komplizierten Verbindungen zu einfacheren ein,

[1]) Siehe: Hans Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, Wiesbaden 1910. — Carl Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1909. — W. Palladin und S. Kostytschew, diese Zeitschr.; Ber. d. Deutsch. botan. Ges.; Zeitschr. f. physiol. Chem. 1906 bis 1910.

[2]) C. Neuberg, Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten I, II, III und IV. Diese Zeitschr. 1908, 1909 und 1910.

und die entstandenen einfachen Zucker werden weiterhin in Osone, Kohlenhydratsäuren usw. umgewandelt.

Weiter beobachteten Henri Bierry, Victor Henri und Albert Ranc[1]) durch die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die d-Fructose einen tiefen Abbau bis zur Bildung von Formaldehyd und Kohlenoxyd. Dasselbe konstatierten bei dem Abbau der Glucose Daniel Berthelot und Henri Gaudechon[2]). Diese Forscher fanden bei dem Abbau der Monosaccharide und Disaccharide Kohlendioxyd, Methan und Wasserstoff.

Wir haben schon damals die Möglichkeit der Bildung von Formaldehyd durch Reduktion des Kohlendioxyds nach der Formel:

$$2CO_2 + 2H_2 = 2HCOH + O_2$$

in Aussicht gestellt.

Man könnte sich auch die Zersetzung der Kohlensäure unter Einwirkung der Sonnenstrahlen nach folgender Gleichung vorstellen:

$$H_2CO_3 + H_2 = HCOH + CH_4 + H_2O + 2O_2.$$

Unsere Hypothese, daß das Kohlendioxyd durch Wasserstoff in statu nascendi unter Einwirkung der Sonnenstrahlen in der chlorophyllhaltigen Zelle zu Formaldehyd reduziert wird, hat sich bewahrheitet, doch muß nebstdem noch in der chlorophyllhaltigen Zelle die von Baeyer beobachtete Reaktion, die durch folgende Gleichung versinnlicht wird:

$$CO_2 + H_2O = HCOH + O_2,$$

stattgefunden haben.

Im Jahre 1860 hat Berthelot die Vermutung ausgesprochen, daß in der chlorophyllhaltigen Zelle das Kohlenoxyd als Kohlenstoffquelle für die Bildung der organischen Substanzen angesehen werden kann. Durch die Einwirkung des Kohlenoxyds auf Wasserstoff soll Formaldehyd entstehen. Infolge der weiteren Kondensation bildet dann nach Berthelots Anschauung die Formaldehydgruppe Zucker.

Baeyer, der sich der Ansicht Berthelots anschloß, behauptete im Jahre 1870, daß unter dem Einflusse des Sonnenlichts sich das Kohlensäureanhydrid in Kohlenoxyd und Sauerstoff zersetzen kann. Das gebildete Kohlenoxyd soll mit Wasser zusammentreten und unter abermaligem Sauerstoffaustritt Formaldehyd nach der Gleichung:

$$CO_2 = CO + O;\ CO + H_2 = CH_2O$$

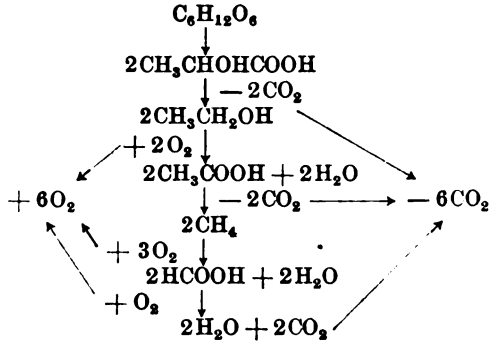
bilden.

---

[1]) Henri Bierry, Victor Henri und Albert Ranc, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. 151, Nr. 4, Paris 1910.

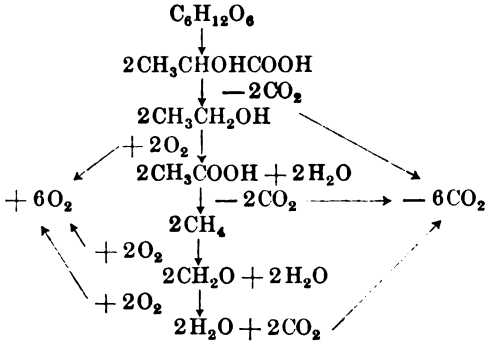
[2]) Daniel Berthelot und Henri Gaudechon, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. 151, Nr. 5, Paris 1910.

Löb[1]) hat unser hypothetisches Schema des Glucoseabbaues durch Atmungsenzyme etwas anders konstruiert. Wir geben daher dieses Schema nachstehend wieder:



Diese Form ist in bezug auf den Assimilationsvorgang gewählt, um sichtbar zu machen, daß das Volumen der bei dem Abbau abgegebenen Kohlensäure mit dem des aufgenommenen Sauerstoffes übereinstimmt.

Das folgende Schema, das Löb zusammenstellte, berücksichtigt die chemisch durchaus mögliche, intermediäre Bildung von Formaldehyd:



Hier sind Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion dem Volumen nach natürlich gleich, nur ist die Verteilung eine andere.

Behufs eines näheren Studiums der photochemischen Synthese der Kohlenhydrate stellten wir neuerdings Experimente an und beobachteten dabei den Einfluß der ultravioletten Strahlen auf gasförmige Körper.[2]) Die ultravioletten Strahlen üben bekanntlich eine chemische Wirkung aus.

[1]) Walter Löb, Zeitschr. f. Elektrochem. 1905; Landwirtschaftl. Jahrb. 1906.

[2]) Julius Stoklasa und Wenzel Zdobnický, Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Anwesenheit von Kaliumhydroxyd, in Abwesenheit von Chlorophyll. Sitzungsber. d. kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathem.-naturw. Klasse, 119, Abt. IIb, 1910.

Wir studierten zunächst die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd, sowie auf den in statu nascendi und nicht in statu nascendi wirkenden Wasserstoff. Auch bezüglich des Einflusses des Wasserstoffes auf Kohlendioxyd, ohne Einwirkung der ultravioletten Strahlen, wurden von uns Versuche angestellt. Ferner machten wir auch Experimente über die Wirkung ultravioletter Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserdampf. Die chemischen Reaktionen, die durch ultraviolette Strahlen entstehen, wurden schon von verschiedenen Forschern studiert.

So zum Beispiel hat H. Herchfinkel[1]) im Laboratorium der Madame Curie bezüglich der Zersetzung der Kohlensäure durch ultraviolettes Licht Versuche ausgeführt. In einem Glasballon mit ca. 80 ccm Kohlensäure hatten sich nach 80 Stunden Belichtung etwa 260 cmm Kohlenoxyd gebildet; ein nicht bestrahlter Ballon enthielt keine Spur von Kohlenoxyd. Es fand eine Zersetzung des Kohlendioxyds in Kohlenoxyd und Sauerstoff statt.

Die Bildung von Ozon unter dem Einfluß von ultraviolettem Licht beobachteten Bordier und Nogier[2]) und Edm. van Aubel[3]).

Diesen Forschern ist es gelungen, als sie mittels einer Quarzquecksilberlampe destilliertes Wasser bestrahlten, darin die Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd nachzuweisen.

Hermann Thiele und Wolf[4]) studierten die Bildung von Ameisensäure unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes und benutzten hierzu eine Hochspannungsquecksilberlampe von Heraeus. Das Reaktionsgefäß war ein Meßkolben aus Quarzglas; um die Wärmestrahlung der Lampe zu verringern, wurden die Meßkolben mit Wasser gekühlt.

Die Bildung von Ameisensäure unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen nach der Gleichung:

$$CO + H_2O = HCO_2H$$

war bei diesen Experimenten sehr unerheblich; dagegen erfährt nach den Ansichten der obengenannten Autoren die Ameisensäure durch die Wirkung des Lichtes tiefeingreifende Veränderungen. Außer Kohlendioxyd und Kohlenoxyd enthielt das hierbei resultierende Gasgemisch noch Methan und Wasserstoff. Bei diesen Versuchen hinterließ beim Verdampfen die belichtete Säure einen hellgelben, hygroskopischen, sauer reagierenden, bitter schmeckenden Niederschlag, der in Wasser

---

[1]) H. Herchfinkel, Chemische Wirkungen der Radiumemanation und des ultravioletten Lichtes, Le Radium 6, 228, 30. August.

[2]) Bordier und Nogier, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. Paris, 147.

[3]) Edm. van Aubel, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. Paris, 150, 96 bis 98.

[4]) H. Thiele und Wolf, Arch. f. Hygiene 60, 29; C. 1907, I. 492.

zum größten Teil löslich, in sehr verdünntem Alkohol vollständig löslich ist. Es entstehen also aus der Ameisensäure durch die Wirkung des Lichtes offenbar hochkomplizierte Körper, eine Tatsache, die für die lebende Pflanze von Bedeutung ist. Thiele und Wolf bemerkten bei dem Verhalten von Ammoniumoxalat eine Ähnlichkeit mit dem der Ameisensäure; das entwickelte Gas bestand zum großen Teil aus Kohlendioxyd.

Während der Zeit, als wir unsere Experimente bezüglich des Einflusses der ultravioletten Strahlen auf die Synthese der Kohlenhydrate ausführten, publizierten Daniel Berthelot und Henri Gaudechon[1]) eine Reihe von Arbeiten „Über die chemischen Wirkungen der ultravioletten Strahlen auf gasförmige Körper". In der Sitzung der Akademie der Wissenschaften in Paris am 20. Juni 1910 legten diese Autoren eine Arbeit vor, in der sie den Nachweis erbrachten, daß ein Gemisch aus 1,95 ccm CO und 0,63 ccm O_2 nach 11stündiger Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe von Heraeus von 110 Volt, 2,5 Ampere und 1 cm Abstand 0,48 ccm CO_2 ergibt; CO_2 allein zeigte bei der Bestrahlung eine scharfe Zersetzung in CO und O_2; ein Gemisch von 1,44 ccm $CO_2 + 2{,}19$ ccm H_2 ergab nach $11^1/_2$stündiger Bestrahlung: 1,30 ccm $CO_2 + 2{,}05$ ccm $H_2 + 0{,}05$ ccm CO neben einigen Tröpfchen Wasser und festem Formaldehyd; bei längerer Bestrahlung (26 Stunden) entstand mehr Wasser und mehr Formaldehyd. Bei genügend langer Einwirkung der ultravioletten Strahlen, z. B. $13^1/_2$ Stunden, vereinigten sich freier Sauerstoff und freier Wasserstoff zu Wasser. Umgekehrt wird Wasserdampf in seine Komponenten zersetzt; erfolgt die Zersetzung in Gegenwart von Kohlenoxyd, so läßt sie sich an der Bildung von Formaldehyd nachweisen, ist dagegen Phosphor zugegen, so wird der entstehende Sauerstoff absorbiert, und Wasserstoff allein bleibt übrig. — Kohlenoxyd und Wasserstoff vereinigten sich unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes zu Formaldehyd. Bei diesen Experimenten wirkten die höchst intensiven Quellen ultravioletten Lichtes auf die sorgfältig getrockneten Gase, die in Quarzröhren von etwa 0,6 mm Wanddicke unter einem Drucke von nahezu 75 cm eingeschlossen waren.

Nun schreiten wir zu unseren eigenen Versuchen.

Experimenteller Teil.

Wir benutzten zu unseren Experimenten eine Quecksilberquarzlampe von der Allgemeinen Elektrizitäts-Gesellschaft in horizontaler Lage, die einen großen Teil ihrer Strahlen nach unten, unter sich, aussendet. Diese Lampe hat 110 Volt und 4 Ampere.

Wir werden jetzt auch mit einer Lampe von Billon-Daguerre zu experimentieren beginnen, die nach den Angaben

[1]) Daniel Berthelot und Henri Gaudechon, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. 150, 1169, 1327, 1517 und 1690, Paris 1910.

des eben genannten Autors Strahlen aussendet, die eine 25mal kräftigere photochemische Wirkung haben, als die bisher bekannten ultravioletten Strahlen.

Unsere Versuche wurden in einer ganz vernickelten Schale aus Kupferblech ausgeführt (siehe Fig. 1), die oben mit einer reinen durchsichtigen Quarzplatte und bei einigen Versuchen mit einer 0,15 mm starken, durchsichtigen Glimmerplatte geschlossen war, denn bekanntlich läßt Glimmer 60% ultravioletter Strahlen in der Länge von 350 bis 240 $\mu\mu$ durch, während Glas z. B. nur etwa 5% durchläßt. Zwischen der Platte und dem Rande der Schale befand sich eine Dichtungsscheibe aus weichem Blei, den Rändern der Schale entsprechend zugeschliffen. Die 6 mm dicke Quarzplatte samt der Dichtungsscheibe war an den Rändern der Schale mit Messingklammern fest zusammengezogen. Andere Dichtungen konnten nicht benutzt werden, da wir organisches Material vollständig vermeiden wollten.

Diese Schale verwendeten wir aus dem Grunde, um sie mit einer großen Menge Gas in Berührung bringen zu können. In die Schale mündeten 3 Röhren. Eine schlangenförmige, mit Capillaröffnungen versehene, durch die Kohlendioxyd aus der Bombe zugeführt wurde. Die zweite, die ca. 1 cm über dem Schalenboden endete, diente zum Zutröpfeln von Lauge bei den Versuchen 3, 4, 5 und 6 und zur Zuleitung von Wasserdampf beim Versuche 2. Die dritte Röhre endete $^1/_2$ cm vom oberen Rande und diente zur Ableitung der überschüssigen und ev. entstehenden Gase. Die etwa mitgerissene Flüssigkeit wurde in einem angeschlossenen Kühler aufgefangen und tropfte in die Schale zurück. Das Kohlendioxyd wurde zuerst in einer Kaliumpermanganatlösung (mit Schwefelsäure angesäuert), dann in ammoniak-alkalischer Silberlösung und zuletzt in konzentrierter Schwefelsäure gewaschen und unter sehr kleinem Druck (ca. $^1/_{20}$ Atm.) in der Weise abgelassen, daß in 1 Sekunde 3 bis 4 Gasbläschen durch die Gas-Waschflaschen gingen. Die ganze Schale war mit ihren Röhren auf dem Metallmantel der Lampe aufgehängt und von einer gläsernen Schutzkugel umschlossen; selbstredend waren die Röhren durch die Öffnungen in dem Metallmantel hindurchgeführt, was am besten aus der Abbildung in der beigefügten Figur 1 ersichtlich ist.

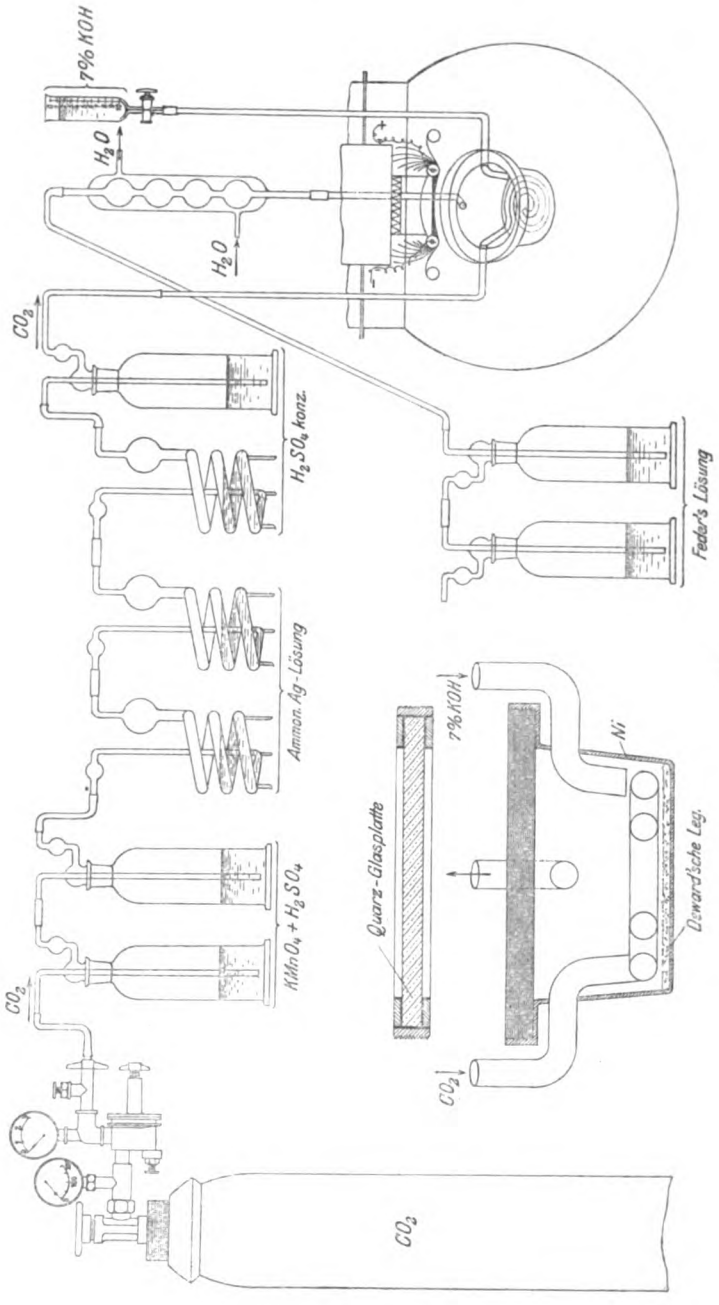

7% KOH
H_2O
H_2O
CO_2
H_2SO_4 konz.
Ammon. Ag-Lösung
$KMnO_4 + H_2SO_4$
CO_2
CO_2
Quarz-Glasplatte
7% KOH
Ni
Dewardsche Leg.
CO_2
Feder's Lösung

Fig. 1.

Zur qualitativen Bestimmung des etwa während der Versuche entstehenden Formaldehyds benutzten wir zwei Gas-Waschflaschen mit Federscher Quecksilberlösung, aus der durch Formaldehyd metallisches graues Quecksilber bereits bei einer Verdünnung von 0,5 mg CH_2O auf 100 ccm ausgeschieden wird. Dieses Reagens verwendeten wir aus dem Grunde, weil es sehr empfindlich ist und die Reaktion auch in der Kälte ziemlich rasch verläuft.[1])

Zur Formaldehydfeststellung benutzten wir auch noch das neue spezifische Formaldehydreagens von Viktor Grafe[2]). Dieses Reagens besteht in einer 1%igen Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure. Läßt man zu einer schwach formolhaltigen wässerigen Lösung etwa 1 ccm des Reagens vorsichtig an der Eprouvettenwand herabfließen, so bildet sich zunächst ein weißer Niederschlag (ausfallendes Diphenylamin), sofort erscheint aber auch an der Berührungsstelle des Niederschlags und des Reagens ein smaragdgrüner Ring. Beim Schütteln der Eprouvette und eventuellen Hinzufügen kleiner Mengen des Reagens färbt sich der ganze Niederschlag tiefgrün infolge Bildung eines grünen Kondensationsproduktes des Formaldehyds und Diphenylamins. Die Reaktion war deutlich.

Den zur Durchführung der Reaktion $2\,CO_2 + 2\,H_2$ in den Versuchen 3, 4, 5 erforderlichen Wasserstoff entwickelten wir durch Zutropfen einer 7%igen, von organischen Stoffen freien Kaliumhydroxydlösung in die Reaktionsschale, auf deren Boden eine pulverige, stark geglühte (bei ca. 250°) Devardasche Legierung (die Legierung enthielt 59% Aluminum, 39% Kupfer und 2% Zink) sich befand. Gleichzeitig wurde durch Parallelversuche folgendes ermittelt:

1. Ob der sich aus 7%igem Kaliumhydroxyd und der Devardaschen Legierung entwickelnde Wasserstoff Federsches Reagens reduziert, wenn er durch die Lösung durchgeleitet wird. In diesem Falle stellten wir fest, daß bei langem Durchstreichen von Wasserstoff nur Spuren von Quecksilber aus dem

[1]) Feder stellte ein Reagens auf Aldehyde, besonders Formaldehyd in folgender Weise dar: 20 g Quecksilberchlorid werden in 1 l Wasser aufgelöst, ferner werden 100 g Natriumsulfit und 80 g Ätznatron ebenfalls in 1 l Wasser gelöst. Beim Gebrauch werden gleiche Volumina beider Lösungen gemischt, und zwar wird die alkalische Sulfitlösung unter Umschwenken schnell zu der Quecksilberlösung hinzugefügt. Es resultiert eine völlig klare Lösung, in der die Gegenwart von ganz geringen Mengen Formaldehyd augenblicklich eine Abscheidung von metallischem Quecksilber hervorruft. (Feder, Arch. d. Pharm. 245, 25, 1907; Die Methoden der organischen Chemie von Th. Weyl [Sohmidt, Aldehyd- und Keton-Gruppe] 2. Band, 4. Lieferung, Leipzig 1909.)

[2]) Viktor Grafe, Österreich. botan. Zeitschr. 1906, Nr. 8.

Federschen Reagens ausgeschieden wurde, während die bei den Versuchen 2, 3, 4 eingetretene Reaktion in der gleichen Zeit eine starke war, was somit auf Rechnung des entweichenden Formaldehyds zu setzen ist.

2. Weiter wurde untersucht, ob die Lösung, in der sich die Devardasche Legierung und der Wasserstoff entwickelt haben, organische Substanzen enthält. Diese Lösung filtrierten wir durch Asbest, neutralisierten mit Schwefelsäure und führten die Reaktion auf organische Substanzen mit Permanganat durch. In der Lösung waren nur Spuren von organischen Substanzen vorhanden.

Nach der kurzen Schilderung unserer Versuchsmethodik gehen wir zur Beschreibung der einzelnen Experimente über.

1. Versuch.

Baeyer hat bekanntlich im Jahre 1870 die Hypothese ausgesprochen, daß Formaldehyd das erste Assimilationsprodukt in den Pflanzen bildet, und daß hieraus Zucker durch eine Serie von Kondensationen entsteht.

Dieser und der folgende von uns angestellte Versuch betraf die Feststellung der Richtigkeit der Baeyerschen Gleichung

$$H_2O + CO_2 = HCOH + O_2.$$

Die Reaktionsschale wurde derart mit destilliertem Wasser gefüllt, daß dessen Spiegel 1 cm unter der Ableitungsöffnung sich befand. Ein schlangenförmiges Bleirohr zur Zuleitung von Kohlendioxyd wurde bis an den Boden der Schale eingetaucht, so daß das Kohlendioxyd durch das Wasser streichen mußte. Die Dauer des Versuches bei ununterbrochener Bestrahlung betrug 70 Stunden.

Während des Versuches erfolgte keine Quecksilberausscheidung aus der Federschen Lösung. Nach Beendigung des Versuches wurde die Schale herausgenommen und mit der Flüssigkeit folgende Reaktionen ausgeführt:

1. Wurde auf das Vorhandensein der organischen Substanzen geprüft. Letztere waren überhaupt nicht nachweisbar.

2. Mit fuchsinschwefliger Säure wurde keine Reaktion auf Aldehyde konstatiert.

3. Mit ammoniak-alkalischer Silberlösung wurde keine Reduktion beobachtet.

Durch diese Reaktionen wurde nachgewiesen, daß sich kein Formaldehyd gebildet hatte und daß in der Lösung keine organischen Substanzen zugegen waren.

2. Versuch.

Der 2. Versuch wurde in der Weise ausgeführt, daß auf den Boden der Schale 20 ccm 7%ige Kaliumhydroxydlösung gegeben wurden. Durch

ein 3 cm über den Boden reichendes Schlangenrohr wurde Kohlendioxyd zugeführt. Durch ein zweites, beim Boden mündendes Rohr wurde Wasserdampf eingelassen. Der Abstand der Quarzplatte vom Brenner betrug 4 cm, die Dauer des Versuches $15^1/_2$ Stunden.

Resultate:

1. Aus der Federschen Lösung wurde im Laufe des Versuches Quecksilber in merklicher Menge ausgeschieden, es waren somit Spuren eines gasförmigen reduzierenden Stoffes entstanden, offenbar Formaldehyd.

2. Von organischen Substanzen waren nur Spuren konstatierbar.

3. Mit ammoniak-alkalischer Silberlösung trat keine Reduktion ein.

4. Mit fuchsinschwefliger Säure keine Färbung. Bei Vorhandensein von Aldehyd wird die Lösung bekanntlich intensiv rot bis violett gefärbt.

5. Die bekannte α-Naphthol-Reaktion nach Molisch lieferte ein negatives Resultat.

Aus dem Angeführten kann geschlossen werden, daß unter diesen Bedingungen zwar Spuren von Formaldehyd auftreten, daß aber nicht im mindesten eine Kondensation des Formaldehyds zu Kohlenhydrat bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd stattgefunden hat, obgleich die Bedingungen für die Entstehung des Kohlenhydrates, nämlich die Dauer der Bestrahlung usw. die gleichen waren, wie bei den folgenden Versuchen.

3. Versuch.

Bei dieser Versuchsreihe handelte es sich um Bestätigung der Gleichung $2\,CO_2 + 2\,H_2 = 2\,HCOH + O_2$.

Diese Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

Auf den Boden der Schale wurden 110 g Devardasche Legierung gegeben und 7%ige Kaliumhydroxydlösung kontinuierlich aus einem Tropftrichter mit Capillarröhrchen zutropfen gelassen. Kohlendioxyd wurde durch ein 3 cm über den Boden der Schale reichendes Spiralrohr zugeführt. Die Bestrahlungsdauer betrug 48 Stunden, der Abstand 3 cm. Kohlendioxyd wurde durch 32 Stunden eingeführt, Wasserstoff durch 48 Stunden entwickelt. Während des Versuches bildete sich in der Federschen Lösung ein beträchtlicher Niederschlag metallisch grauen Quecksilbers. Nach Beendigung des Versuches wurde das in der Versuchsschale befindliche Reaktionsgemisch im siedenden Wasserbad mit einem kleinen Quantum reinen destillierten Wassers 3 Stunden hindurch gründlich ausgewaschen. Hierauf wurde über reinen Asbest abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und folgende Reaktionen ausgeführt:

1. Eine große Menge organischer Substanzen wurde mittels Kaliumpermanganats und durch die Verbrennung mit Sicherheit nachgewiesen.

2. Ammoniak-alkalische Silberlösung wurde schon in der Kälte schwarz gefärbt; durch Kochen setzte sich das Silber als Spiegel an das Glas.

3. Durch Kochen mit Fehlingscher Lösung entstand Cu_2O.

4. Die untersuchte Lösung zeigte sich optisch-inaktiv.

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß durch Photosynthese die Bildung von Formaldehyd stattgefunden hat und aus dem gebildeten Formaldehyd durch Kondensation ein unbekanntes Kohlenhydrat entstanden ist.

4. Versuch.

Auf Grund der vorstehenden Befunde schritten wir zur Wiederholung des vorerwähnten Versuches, was unter den sorgfältigsten Bedingungen geschah. Die Dauer des Versuches nahm 46 Stunden in Anspruch. Der Abstand betrug 4 cm, das Gewicht der benützten Devardaschen Legierung 140 g. Während des Versuches trat abermals eine starke Reduktion des Federschen Reagens ein.

Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser in eine Porzellanschale übergespült, die Stückchen der Legierung mit einem Schlägel zerrieben und 2 Stunden am Wasserbad unter fortwährendem Rühren bei einer kleinen Flamme (Temperatur 90° C) ausgekocht, wobei ein deutliches Brausen wahrzunehmen war. Sodann wurde über Asbest filtriert, quantitativ ausgewaschen, mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure bis zur neutralen Reaktion neutralisiert, am Wasserbad (90° C) eingedampft und nach Abfiltrieren auf 250 ccm aufgefüllt. Bei der Konzentration wurde die ursprünglich farblose Flüssigkeit gelb und schied eine braune gallertartige Substanz aus, wobei sich ein schwacher Karamelgeruch bemerkbar machte.

Die erwähnte Versuchsflüssigkeit besaß eine Dichte von 1,01315, welch letztere pyknometrisch bei $17^1/_2{}^0$ C bestimmt wurde. Die Flüssigkeit war von gelblichgrüner Farbe.

Mit der Lösung wurden folgende qualitative Reaktionen ausgeführt:

1. Zuerst wurde in der Lösung die Trockensubstanz bestimmt. Auf einer Platinschale wurden 20 ccm Lösung langsam abgedampft, dann im Vakuum-Trockenapparat bei 80° C getrocknet, gewogen und hierauf langsam verascht. Die Asche bestand bloß aus Kaliumchlorid. Es wurden pro 250 ccm der Lösung 2,5625 g organischer Substanz gefunden.

2. Von organischen Substanzen war mittels Kaliumpermanganats und durch die Verbrennung eine große Menge konstatierbar.

3. Ammoniak-alkalische Silberlösung wurde schon in der Kälte schwarz gefärbt; durch Kochen setzte sich das Silber als Spiegel an das Glas.

4. Bei der Nylanderschen Probe mit alkalischer Wismutlösung (von Almèn und Nylander modifizierte Böttgersche Probe) wurde nach einem 2 Minuten lang währenden Sieden Wismut ausgeschieden.

5. Durch Erhitzen mit konzentrierter H_2SO_4 Bräunung.

6. Durch Kochen mit konzentrierter Chlorwasserstoffsäure rotgelbe Färbung.

7. Die Lösung wurde auf einer Platinplatte bis zur Trockenheit abgedampft. Zuerst bräunte sich die Flüssigkeit fortwährend; beim Abdampfen gab sie einen intensiven Karamelgeruch von sich, durch weiteres Erhitzen schied sich in reichlicher Menge Kohlenstoff aus, der verbrannt wurde. Die in Wasser gelöste Asche ergab mit Silbernitrat eine Reaktion auf Chlor.

8. Mit der alkoholischen Lösung mit α-Naphthol bildete sich beim Einlaufen von konzentrierter, reiner, von Salpetersäure ganz freier Schwefelsäure eine violette Zone.

9. Bei Verwendung von Thymol bildete sich eine intensiv gefärbte rote Zone.

10. Mit Resorcin und konzentrierter Salzsäure eine intensiv rote (kirschrote) Färbung, nach einer Weile ein brauner Niederschlag.

11. Die untersuchte Lösung war optisch-inaktiv.

12. Hierauf wurde die Reduktion mit Fehlingscher Lösung vorgenommen und das reduzierte Kupfer quantitativ bestimmt. Dazu wurde die bekannte Methode von Allihn in Anwendung gebracht. Das ausgeschiedene Kupferoxyd, das mittels einer Asbestschicht im Goochschen Platintiegel aufgefangen wird, ist nach erfolgtem Auswaschen reduziert und als metallisches Kupfer gewogen worden, Das Gewicht des aus 10 ccm Lösung reduzierten Kupfers betrug 0,1190 g. Umgerechnet auf 250 ccm oder auf die gesamte entstandene organische Substanz beträgt dies 2,975 g Kupfer.

13. In der Lösung wurde auch der Kohlenstoff nach Messinger bestimmt. Wir fanden, daß in 2,5625 g Substanz 0,988 g Kohlenstoff vorhanden waren. In Prozenten ausgedrückt ergibt dies 38,55.

14. Um uns zu orientieren, ob aus der Lösung Krystalle zur Ausscheidung gelangten, haben wir die Lösung im Vakuum bei 55° C bis auf ein kleines Volum abgedampft und stehen gelassen. Krystalle wurden nicht ausgeschieden. Dann wurde die Lösung nochmals abgedampft und mit Äthylalkohol behandelt. Aus den alkoholischen Lösungen wurden ebenfalls keine Krystalle ausgeschieden.

15. Phenylhydrazinreaktionen.

Die Lösung wurde mit essigsaurem Phenylhydrazin versetzt, 3 Stunden unter gelegentlichem Umrühren im kochenden Wasserbade erhitzt. Es entstanden bräunlich-gelbe Sedimente.

Diese Sedimente wurden in destilliertem Wasser ausgekocht, dann mit destilliertem Wasser ausgewaschen und auf einer Tonplatte getrocknet. Diese Substanz war in Wasser unlöslich, in Alkohol sehr leicht löslich, in Äther und Benzol teilweise löslich. Die alkoholische Lösung wurde langsam abgedampft, und wir erhielten Phenylosazone, die unter dem Mikroskop kleine krystallinische Nadeln von gelbbrauner Farbe zeigten. Die Phenylosazone wiesen einen Schmelzpunkt von 188 bis 192° C auf. Diese Osazone kochten wir in Benzol aus. Ein Teil davon löste sich, ein größerer Teil blieb jedoch ungelöst. Diese unlösliche Substanz wurde ausgewaschen und nochmals in Alkohol gelöst. Die Lösung wurde bis

zur Krystallisation abgedampft. Osazone wurden ausgeschieden, die unter dem Mikroskop eine Reihe schöner, gelber, krystallinischer Nadeln in der Größe von 150 bis 900 μ (s. Fig. 2 in Tafel III) zeigten. Diese Phenylosazone schmelzen bei 196 bis 200° C.

16. Gärversuch mit Saccharomyces cerevisiae.

Von großem Interesse war natürlich die Frage, ob der von uns synthetisch gewonnene Zucker ein Gärvermögen besitzt. Ich habe mit meinem Mitarbeiter Franz Černý, Adjunkt der gärungsphysiologischen Abteilung unserer Versuchsstation, Gärversuche mit unserem fraglichen Kohlenhydrat vorgenommen, aber gefunden, daß der synthetisch gewonnene Zucker bei Gegenwart von Pepton und aller mineralischen Nährstoffe nicht gärungsfähig ist. Die Menge des gebildeten Kohlendioxyds war fast dieselbe wie bei den blinden Versuchen.

Um uns zu überzeugen, ob der durch die photochemische Synthese produzierte Zucker durch die Schimmelpilze und Bakterien zersetzt werden kann, werden wir noch eingehende Untersuchungen vornehmen.

Aus unseren Versuchen geht deutlich hervor, daß unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserstoff, welch letzterer in statu nascendi vorhanden ist, eine Photosynthese nach folgender Gleichung vor sich ging:

$$2CO_2 + 2H_2 = 2HCOH + O_2.$$

Bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd kondensierte sich der gebildete Formaldehyd zu Zucker oder zu mehreren Zuckerarten.

5. Versuch.

Dieser Versuch war ein blinder Versuch, das heißt, es wurde Kohlendioxyd durchstreichen gelassen, Wasserstoff entwickelt, aber nicht mit der Quecksilberlampe belichtet.

Behufs Erzielung gleicher Temperaturbedingungen wurde die Schale von unten vorsichtig mit einer mäßigen Flamme erhitzt. Der Versuch dauerte 34 Stunden; das Gewicht der verwendeten Devardaschen Legierung betrug 102 g. Während des Versuches schied sich aus der Federschen Lösung kein Quecksilber aus. Nach Beendigung des Versuches wurden die gleichen Prozeduren wie bei Versuch 3 und 4 vorgenommen.

Ameisensäure wurde nachgewiesen, aber kein Kohlenhydrat.

6. Versuch.

Von großer Bedeutung ist die Frage, ob der Wasserstoff, der sich nicht in statu nascendi befindet, dieselbe Energie besitzt,

das Kohlendioxyd zu zersetzen und Formaldehyd zu bilden, wie der Wasserstoff in statu nascendi.

Diesen Versuch leiteten wir genau so ein wie die früheren. Der Wasserstoff wurde aus einer Bombe ausströmen gelassen und sorgfältig gereinigt. Wir reinigten und trockneten das Wasserstoffgas durch eine Batterie von drei Gas-Waschflaschen, deren erste mit gesättigter wässeriger Kaliumpermanganatlösung beschickt war, während die zweite Kalilauge, die dritte reine Schwefelsäure enthielt. Dieser Versuch dauerte 32 Stunden. Während des Versuches schied sich aus der Federschen Lösung kein Quecksilber aus. Zur Untersuchung der Versuchsflüssigkeit wurden dieselben Methoden angewandt, wie sie bei den früheren Versuchen genau angeführt wurden. In der Lösung konnten wir keinen Formaldehyd und kein Kohlenhydrat nachweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Berthelot und Gaudechon nicht überein.

* * *

Wir können uns heute über den chemischen Charakter des Zuckers, der durch die photochemische Synthese entstanden ist, noch nicht mit Bestimmtheit äußern, da wir diese Versuche noch einigemal wiederholen müssen, um genaue, verläßliche Daten zu erhalten. Es fehlt bisher die Reindarstellung und Trennung der Zuckerarten sowie die Bestimmung ihrer Konstitution. Es läßt sich aber wohl annehmen, daß durch die photochemische Synthese labile Formen der Zuckerarten entstehen, und es ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß wir schon nach Beendigung der Versuche die durch die Metamorphose der labilen Zuckerarten entstandenen Zersetzungsprodukte untersuchten. Heute können wir nur so viel mit Sicherheit behaupten, daß bei dem durch die photochemische Synthese entstandenen Zucker (Zuckerarten) alle asymmetrischen Bedingungen fehlen.

Der gefundene Schmelzpunkt unserer Osazone zeigt, daß Formose und β-Formose sowie β-Acrose in unserer Lösung nicht vorhanden waren. Formose-Phenylosazone schmelzen nach Loew bei 122°, nach Fischer bei 133°. β-Formose-Phenylosazone schmelzen bei 123°, nach den späteren Angaben sogar bei 148°. Das β-Acrosazon $C_{18}H_{22}N_4O_4$ schmilzt bei 158 bis 159°.

Die erste Gruppe unserer Phenylosazone zeigt, wie bereits erwähnt, einen Schmelzpunkt von 188 bis 192°, die zweite Gruppe einen solchen von 196 bis 200°.

Gemäß den Versuchsergebnissen Fischers[1]), Loews[2]), Neubergs[3]), Eulers[4]) sowie Löbs und Pulvermachers[5]) entstehen bei der Zuckersynthese aus Formaldehyd immer Pentosen. Wir konnten aber das Auftreten von Pentosenreaktionen nicht beobachten. Eine charakteristische Pentosenreaktion wurde niemals konstatiert.

Löb und Pulvermacher haben in der letzten Zeit über die Zuckersynthese aus Formaldehyd Versuche angestellt und die Kondensation des Formaldehyds unter der Einwirkung von Bleihydroxyd ausgeführt. Derartige Versuche waren bekanntlich schon früher von Lobry de Bruyn und van Eckenstein[6]) vorgenommen worden.

Löb und Pulvermacher erhielten einen Trockensirup, der vergärbaren Zucker enthalten hat. Der von uns durch die photochemische Synthese erzeugte Zucker ist jedoch nicht vergärbar.

* * *

Die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht bedingt eine Zufuhr von chemischer Energie. Durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserstoff, welch letzterer in statu nascendi vorhanden ist, wird als erste Phase der Zuckersynthese Formaldehyd gebildet. Dies scheint nach unseren Berechnungen ein exothermischer Prozeß zu sein.[7]) Aus dem Formaldehyd entsteht bei Gegenwart von Kali durch Kondensation Zucker, dessen Konstitution wir aber jetzt noch nicht näher charakterisieren können, und dies wird uns vielleicht erst bei weiteren Versuchen möglich sein. Daß sehr leicht aus Formaldehyd Hexosen zu gewinnen sind, dokumentieren die Versuchsergebnisse Butlerows, Loews, Fischers, Neubergs, Eulers, Passmores usw.

Bei den autotrophen Pflanzen ist der erste Prozeß der Kohlendioxydreduktion Aufbau und Assimilation, der zweite ist

---

[1]) Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 988, 1888; 22, 359, 1889.

[2]) Loew, Ebenda 21, 271, 1888; 22, 478, 1889.

[3]) Neuberg, Ebenda 35, 2632, 1902.

[4]) Euler, Ebenda 39, 45, 1906.

[5]) Walter Löb und Georg Pulvermacher, diese Zeitschr. 26; 3. und 4. Heft, 231, 1910.

[6]) Lobry de Bruyn und van Eckenstein, Recueil des travaux chimiques des Pays Bas 18, 309.

[7]) Ob dies ein endothermischer oder ein exothermischer Prozeß ist, werden unsere weiteren Experimente beweisen.

gerade im Gegenteil Abbau, Dissimilation, und man darf wohl vermuten, daß diese beiden Prozesse in kausalem Konnex stehen. Nach dem jetzigen Stande der Forschungen läßt sich mit vollem Recht voraussetzen, daß in der chlorophyllhaltigen Pflanzenzelle als erstes Reduktionsprodukt des Kohlendioxyds Formaldehyd gebildet wird. Es besteht eine große chemische Wahrscheinlichkeit für die Formaldehydhypothese, da sich kein anderer Stoff mit einem Kohlenstoffatom im Molekül so zur Bildung hoch zusammengesetzter organischer Verbindungen eignet, wie der Formaldehyd.

Die Kohlensäure, die durch die Spaltöffnungen dringt, wird von den chlorophyllhaltigen Zellen sofort absorbiert und das Kali, das stets in Chlorophyll vorhanden ist, wird in Kaliumbicarbonat umgewandelt. Das Kaliumbicarbonat gelangt dann in das Protoplasma der assimilierenden Gewebselemente.

Die reine Kohlensäure wird also in der chlorophyllhaltigen Zelle durch den nascierenden Wasserstoff nicht reduziert. Die Reduktion findet durch das Kaliumbicarbonat, das in seiner Entstehung begriffen ist, in der Zelle statt. Bei Gegenwart von Kali kondensiert sich der Formaldehyd zu Kohlenhydraten. Es ist auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß sich neben Formaldehyd auch peroxydartige Stoffe bilden, die leicht unter Sauerstoffabgabe zerfallen.

Daß überhaupt gebundene Kohlensäure, und zwar in Form von Bicarbonaten, für den Stoffwechsel in Betracht kommt, wissen wir schon aus alten Versuchen, und dies wurde auch von Hassak und Nathansohn[1]) bestätigt, die verschiedene Pflanzen in Lösungen von Bicarbonaten beobachteten und dabei die Ausscheidung von Sauerstoff konstatieren konnten.

Es ist ja bekannt, daß die Wasserpflanzen die Kohlensäure aus den Bicarbonaten assimilieren. Uns ist es gelungen, durch exakte Experimente nachzuweisen, daß auch die Landpflanzen imstande sind, in kohlensäurefreier Atmosphäre Kaliumbicarbonat zu assimilieren und für den Aufbau neuer lebender Substanz mit Vorteil zu benützen.

---

[1]) Nathansohn, Über die Bedingungen der Kohlensäureassimilation in natürlichen Gewässern. Ber. d. K. S. Ges. d. Wiss. 59, 1907.

Das Kalium ist stets neben Phosphor in dem Chlorophyll vorhanden. Wir haben in unseren Chlorophyllpräparaten 0,43 bis 0,57% Kaliumoxyd gefunden.[1])

Von großem Interesse ist gewiß die Tatsache, daß schon ohne Einwirkung der ultravioletten Strahlen das Kaliumbicarbonat und Natriumbicarbonat, besonders wenn sie in Entstehung begriffen sind, d. h., wenn die Bedingungen zu ihrer Bildung gegeben sind, durch nascierenden Wasserstoff leicht zu ameisensaurem Salz reduziert werden. Magnesiumbicarbonat wird von dem nascierenden Wasserstoff überhaupt nicht reduziert.

Wie wir schon in der Einleitung unserer vorliegenden Abhandlung erwähnt haben, entsteht der Wasserstoff tatsächlich in der Pflanzenzelle bei dem durch die glucolytischen Enzyme hervorgerufenen Atmungsprozeß. Die Aufgabe des Chlorophylls bei dem Assimilationsprozeß besteht in der Absorption der ultravioletten Strahlen. Das Chlorophyll müssen wir als einen Sensibilisator der Strahlenenergie in der Pflanzenzelle ansehen. In der chlorophyllhaltigen Pflanzenzelle entsteht Formaldehyd nicht nur durch die Reduktion des Kohlendioxyds mittels Wasserstoffs, der unter Einwirkung der Atmungsenzyme gebildet wird, sondern Formaldehyd bildet sich auch aus Wasser und Kohlendioxyd, und zwar in der Weise, daß das Wasser wahrscheinlich zersetzt wird und der entstandene Wasserstoff die Kohlensäure zum Formaldehyd reduziert. Diese beiden Prozesse verlaufen natürlich parallel nebeneinander unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen.

Wir können heute mit ruhigem Gewissen annehmen, daß Formaldehyd in der chlorophyllhaltigen Pflanzenzelle vorhanden ist und von derselben auch assimiliert wird. Diesbezügliche mühsame Untersuchungen hat zuerst G. de Pollacci[2]) vorgenommen.

---

[1]) Julius Stoklasa, Beiträge zur Kenntnis der physiol. Funktion des Kalis im Pflanzenorganismus. Zeitschr. f. landw. Versuchswesen in Österreich 1908.

[2]) Pollacci, Atti Acad. dei Lincei 1907.

Czapek unterzog Pollaccis Arbeiten einer Kritik und wies darauf hin, daß die meisten dieser Reaktionen, die Pollacci vornahm, allgemeine Aldehydreaktionen sind, d. h. auch von anderen Aldehyden außer Formaldehyd gegeben werden.

Auch Usher und Priestley[1]) haben Formaldehyd in den grünen Blättern konstatiert.

In neuester Zeit ist es Viktor Grafe[2]) gelungen, durch ein rein spezifisches Formaldehydreagens Spuren von Formaldehyd in den assimilierenden Blättern nachzuweisen.

Wir können die Befunde Grafes nur bestätigen, nachdem wir ebenfalls in der Lage waren, in dem Destillat aus den Blättern Formaldehyd festzustellen. Die bezüglichen Versuche hat in unserem Laboratorium E. Senft ausgeführt.

Weitere Beiträge zum Nachweis des Formaldehyds in Pflanzen publizierte L. Gentil[3]). Die Feststellung des durch die Destillation im Vorlauf angereicherten Formaldehyds erfolgte auf fünffache Weise:

1. nach Farnsteiner mit schwefliger Säure und Eisenchlorür;
2. nach Tollens mit ammoniakalischer Silberlösung;
3. nach Lebbin mittels einer alkalischen Resorcinlösung;
4. mit Dimethylanilin und
5. mit Anilin.

Aus den Ergebnissen Gentils können wir folgende Schlüsse ziehen:

„1. Es konnte Formaldehyd in den Blättern und Wurzeln der Rübe während deren ganzen Vegetationszeit nachgewiesen werden.

2. Die Menge des freien Formaldehyds ist gering, aber bestimmbar.

3. Während des Verlaufes der Vegetation ist die Menge des Formaldehyds in den Blättern größer als in der Wurzel. Dies ist erklärlich, da die Blattorgane die Formaldehydbildner sind.

4. Die Menge des Formaldehyds in den frischen Blättern scheint pro Kilogramm regelmäßig 0,0056, 0,0051, 0,0052, 0,0053 zu betragen, während in den Wurzeln große Schwankungen im Formaldehydgehalt gefunden wurden, 0,0036, 0,0050, 0,00428, 0,005, 0,004 g.

5. Sobald die Blätter vergilben, beobachtet man nur zu vernachlässigende Spuren von Formaldehyd."

S. B. Schryver[4]) hat Formaldehyd in den chlorophyllhaltigen Organen nachgewiesen und gefunden, daß Formaldehyd von der Pflanzenzelle assimiliert wird.

---

[1]) Fr. L. Usher und J. H. Priestley, Proc. Roy. Soc. 77, 369, 1906.

[2]) Viktor Grafe, Über ein neues spezifisches Formaldehydreagens. Österr. botan. Zeitschr. 1906, Nr. 8.

[3]) L. Gentil, Beiträge zum Nachweis des Formaldehyds in Pflanzen (Rüben). Bull. des Chim. de Sucr. et Dist. 27, 169 bis 179, 1909 bis 1910.

[4]) S. B. Schryver, The Photochemical Formation of Formaldehyde in Green Plants. Proc. Roy. Soc. B. 82.

In den jüngsten Arbeiten von Viktor Grafe und Emmy Vieser[1]) sowie Viktor Grafe und Leopold R. v. Portheim[2]) wird der Nachweis erbracht, daß Formaldehyd von der grünen Pflanze assimiliert werden kann und daß das Wachstum der Phaseolusblätter durch Formaldehyd gefördert wird.

Weitere Mitteilungen über Kohlensäureassimilation und Ernährung von Pflanzen mit Formaldehyd hat Th. Bokorny[3]) geliefert. Dieser Forscher hat schon in seinen früheren darauf Bezug habenden Arbeiten gezeigt und durch seine jetzigen Untersuchungen zweifellos nachgewiesen, daß Formaldehyd zur Assimilation und Stärkebildung verwendet werden kann.

Bemerkenswert ist noch, daß sich die grünen Pflanzenteile gegenüber dem Formaldehyd sehr widerstandsfähig erwiesen, während bekanntlich Formaldehyd Pilze und Bakterien schnell abtötet. Es sind dies namentlich die Untersuchungen von Treboux[4]), der gefunden hat, daß sogar noch 0,001 % ige Formaldehydlösungen für die Elodea nicht schädlich wirken.

Eine hochinteressente Ergänzung zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, daß K. Grube[5]) unter E. Pflügers Anleitung gezeigt hat, daß Schildkrötenleber in sehr verdünnter Formaldehydlösung Glykogen bildet.

Wenn man die Resultate der photochemischen Synthese auf die biologischen Vorgänge in der chlorophyllhaltigen Pflanzenzelle überträgt, so können wir die Entstehung des Kohlenoxyds und die Bildung des Glykolaldehyds aus feuchtem Kohlenoxyd und Wasserstoff durchaus nicht annehmen, Kohlenoxyd ist nach unseren Untersuchungen für die chlorophyllhaltige Zelle schon in minimalen Mengen ein starkes Gift.

Durch unsere weiteren physiologischen Untersuchungen sind wir zu dem Resultate gelangt, daß die ultravioletten Strahlen nicht nur auf die Bildung, sondern auch auf die Metamorphose des Chlorophylls bei den autotrophen Pflanzen einen großen Einfluß ausüben. Diese Experimente wurden von der Keimung angefangen bis zur Blüte und zum Fruchtansatz an autotrophen Pflanzen in normalem und etioliertem Zustande vorgenommen. Die Ergebnisse der diesbezüglichen Versuche werden wir in einer speziellen Abhandlung ausführlich publizieren.

---

[1]) Viktor Grafe und Emmy Vieser, Untersuchungen über das Verhalten grüner Pflanzen zu gasförmigem Formaldehyd. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, Heft 7, 1909.

[2]) Viktor Grafe und Leopold R. v. Portheim, Orientierende Untersuchungen über die Einwirkung von gasförmigem Formaldehyd auf die grüne Pflanze. Österr. botan. Zeitschr. 59, 19 bis 25 u. 66 bis 74, 1909.

[3]) Th. Bokorny, Arch. f. d. ges. Physiol. 128, 565, 1909.

[4]) O. Treboux, Flora 1903, 73.

[5]) K. Grube, Pflügers Archiv 121, 636; Ibid., 126, 585.

Ich will hier nur noch erwähnen, daß die ultravioletten Strahlen eine rasche Chlorophyllsynthese in den etiolierten Pflanzenorganen hervorrufen. Schon nach 1 Stunde von dem Beginn der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht an konnte man eine Ergrünung der Cotyledonen der etiolierten Keimlinge wahrnehmen. Ebenso ergrünten die etiolierten Blätter der Zuckerrübe schon nach 1 Stunde. Nach 2 Stunden ging die Ergrünung in eine sattgrüne Farbe über. Die Keimlinge, die dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, sowie die etiolierten Blätter der Zuckerrübe haben erst nach 6 Stunden eine gelbgrüne Farbe angenommen, und die in der Brutkammer vorhandenen Pflanzen befanden sich natürlich in einem vollständig etiolierten Zustande. Das Chlorophyll in der lebenden Pflanzenzelle wurde bei gewissen Pflanzen unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen nach 2 Stunden noch nicht zerstört, doch wie wir uns durch unsere Versuche überzeugt haben, wurden durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen die Zellen von Azotobacter-chroococcum bereits nach 9 Sekunden völlig vernichtet.

Zusammenfassung.

1. Durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Wasser und Kohlendioxyd ohne Gegenwart von Kaliumhydroxyd wird weder Formaldehyd noch Kohlenhydrat gebildet.

2. Durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Wasserdampf und Kohlendioxyd bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd wird Formaldehyd gebildet, aber gar kein Kohlenhydrat.

3. Durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserstoff, welch letzterer sich nicht in statu nascendi befand, bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd wurde kein Formaldehyd und kein Kohlenhydrat gebildet.

4. Ohne Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserstoff, welch letzterer sich in statu nascendi befand, bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd bildete sich Ameisensäure.

5. Durch die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kohlendioxyd und Wasserstoff, welch letzterer sich

in statu nascendi befand, bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd bildete sich Zucker.

Die Synthese des Zuckers aus Kaliumbicarbonat, das in Entstehung begriffen ist, und nascierenden Wasserstoff unter Einwirkung der ultravioletten Strahlen haben wir zuerst beobachtet und die Resultate unserer diesbezüglichen Betrachtungen stehen bis jetzt allein da.

6. Wenn man unsere Resultate auf die biologischen Vorgänge in der chlorophyllhaltigen Zelle überträgt, so kann man annehmen, daß die reine Kohlensäure in der chlorophyllhaltigen Zelle durch den nascierenden Wasserstoff nicht reduziert wird. Die Reduktion findet aus dem Kaliumbicarbonat, das in seiner Entstehung begriffen ist, in der Zelle statt. Bei Gegenwart von Kali kondensiert sich der Formaldehyd zu Kohlenhydraten.

Fig. 2.

Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus.

Von

Wilhelm Völtz und August Baudrexel.

(Aus der ernährungsphysiologischen Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 3. Januar 1911.)

Die Hefe wird in kleinen Mengen in den verschiedenen Bieren, in größeren Mengen in den Backwaren regelmäßig genossen.[1]) Außerdem werden dem Fleischextrakt ähnliche Präparate aus Hefe hergestellt. Jedoch sind die bisher zum Verzehr durch den Menschen gelangten Quantitäten Hefe verschwindend gering im Vergleich zu den gewaltigen Überschüssen an Hefe, welche die verschiedenen Gärungsgewerbe liefern, und die bisher größtenteils ungenutzt verloren gingen. In neuester Zeit wird die Hefe durch Trockenapparate in ein Dauerpräparat von fast unbegrenzter Haltbarkeit übergeführt.

Was den Eiweiß- und Energiegehalt der Trockenhefe anbelangt, so enthielt das für den vorliegenden Versuch verwendete Präparat 53,4% Eiweiß ($N \times 6{,}25$) und 4,521 Cal. pro Gramm. Eine andere Trockenhefe, die der eine von uns zu einem Ausnutzungsversuch am Hunde[2]) benutzte, war ganz ähnlich zusammengesetzt; dieselbe enthielt 53,4% Eiweiß und 4,487 Cal.

Die Verdaulichkeit des Hefeeiweiß berechnet sich auf Grund der in dieser Versuchsreihe am Hunde erhaltenen Daten zu

---

[1]) M. Delbrück, Hefe ein Edelpilz. Wochenschr. f. Brauerei 27, Nr. 31, 375, 1910.

[2]) W. Völtz, Über den Einfluß verschiedener Eiweißkörper und einiger Derivate derselben auf den Stickstoffumsatz usw. Pflügers Archiv 107; 388, 1905.

87,2%, so daß die betreffende Hefe also 46,56% verdauliches Eiweiß enthielt; das ist ein sehr hoher Prozentsatz.

In Versuchen an verschiedenen Tierarten, die wir gemeinsam mit J. Pächtner ausführten und die demnächst zum Abschluß gelangen werden, fanden wir, daß die Hefe in diätetischer Hinsicht nur günstig zu beurteilen ist. Das Hefeeiweiß wurde zu 88%, die Calorien zu 94% resorbiert (Versuche an Schafen). Ferner konnte die Hefe allein den Bedarf des Organismus an N-haltigen Nährstoffen und an organischen Genußstoffen längere Zeit, und zwar auch bei wachsenden und säugenden Tieren decken (Versuche an Ratten).

Der bekannte bittere Geschmack der Hefe ist den Tieren durchaus nicht unangenehm, sie verzehren große Hefemengen anstandslos, und zwar bereits vom ersten bzw. zweiten Tage ab. Die als menschliches Nahrungsmittel zur Verwendung kommende Hefe muß zuvor entbittert werden; die Entbitterung erfolgt z. B. durch Behandlung mit einer Na_2CO_3-Lösung in der Kälte; über die Entbitterung des von dem einen von uns während des Stoffwechselversuches genossenen Hefepräparates werden wir noch detailliertere Angaben machen. Die entbitterte Hefe besitzt einen charakteristischen, jedoch keineswegs unangenehmen Geschmack und Geruch, sie könnte ohne Zusätze und ohne besondere Zubereitung gegessen werden; besser schmeckt dieselbe natürlich in küchenmäßiger Zubereitung mit anderen Nahrungsmitteln. Auf Anregung von M. Delbrück[1]) haben 12 Herren des Instituts 4 Wochen lang mit dem Mittagessen ungefähr je 20 g Trockenhefe genossen. Die Mahlzeit wurde stets mit bestem Appetit verzehrt. Die Trockenhefe enthält so viel Eiweiß wie die 2,5fache Gewichtsmenge Fleisch, bzw. so viel Calorien wie die 3,3fache Fleischmenge.[2])

Den Ausnutzungsversuch am Menschen haben wir auf Veranlassung von M. Delbrück ausgeführt. Versuchsperson war der eine von uns (Baudrexel). Die Lebensweise blieb in bezug auf die Tätigkeit und die Einnahme der Mahlzeiten die gewohnte. Baudrexel stand um

---

[1]) Näheres siehe unter M. Delbrück, Jahrbuch d. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei in Berlin, 13, 31 bis 35, 1910.

[2]) Nach N. Zuntz enthält mittelfettes Ochsenfleisch 21% Eiweiß und 137 Calorien in 100 g. Siehe unter N. Zuntz und A. Loewy, Lehrbuch der Physiologie des Menschen, Leipzig 1909, S. 703.

$^3/_4$8 Uhr auf, bereitete sich das Frühstück und grenzte vor dem Genuß desselben um $8^1/_4$ Uhr seinen Harn durch Entleerung der Blase ab. Dann stellte er sein Körpergewicht fest und frühstückte. Hierauf begab er sich in das Laboratorium und war hier von $8^1/_2$ Uhr bis ca. 3 Uhr tätig; von ca. $12^1/_4$ bis $12^3/_4$ Uhr nahm Baudrexel das Mittagessen ein. Nach der Vespermahlzeit um ca. 4 Uhr machte Baudrexel einen Spaziergang von ca. 1 bis $1^1/_2$ Stunden. Das Abendessen verzehrte er um ca. $^1/_2$8 Uhr; etwa um 11 Uhr ging Baudrexel zu Bett.

Es kam uns bei dieser Versuchsreihe darauf an, ziemlich große Hefemengen zum Verzehr zu bringen, und zwar unter günstigen Bedingungen für eine N-Retention, um festzustellen, in welchem Umfange die Eiweißkörper der Hefe für den Ansatz im erwachsenen Organismus in Frage kommen bzw. als Ersatz für das andernfalls der Zersetzung anheimfallende Körpereiweiß dienen konnten. Aus diesen Erwägungen ergab sich folgende Versuchsanordnung:

Bei der Aufstellung der Kostnormen in qualitativer Hinsicht wurden die subjektiven Wünsche der Versuchsperson berücksichtigt. Die Quantitäten der Nahrungsmittel wurden so bemessen, daß der Caloriengehalt während der Grundregimeperiode den Bedarf ungefähr deckte, während der Eiweißgehalt der Kost etwas zu gering bemessen wurde, um eben bezüglich der N-Bilanzen im Vergleich mit den betreffenden Daten der Hauptperiode stark abweichende Werte zu erhalten. Die Reihenfolge der Perioden war folgende:

I. Die erste Grundregimeperiode.

Die Kost enthielt täglich 60,7 g Eiweiß ($N \times 6{,}25$) und 2554 Calorien. Diese Periode wurde 5 Tage durchgeführt. Die Aufstellung der N-Bilanzen und des Energieumsatzes erfolgte vom 3. Tage ab, also während 3 Tage.

II. Die Hefeperiode.

Dieselbe dauerte 4 Tage. Außer der Grundration wurden 100 g entbitterte Trockenhefe pro Tag mit 8,55 g N und 452,05 Calorien verzehrt, so daß dieses Regime insgesamt 114 g Eiweiß ($N \times 6{,}25$) und 3006 Calorien enthielt. Sowohl die Grundregimeperiode I als auch die Hefeperiode II konnten ohne jede Störung durchgeführt werden. Eine abschließende Grundregimeperiode III, deren Durchführung wir ebenfalls ge-

plant hatten, mußte leider während des zweiten Versuchstages abgebrochen werden. Am ersten Tage dieser Periode kehrte Baudrexel, weil er Hunger empfand, frühzeitig von seinem Spaziergang zurück und bereitete sich sein Abendessen. Während desselben schlief er infolge starker Ermüdung ein und erwachte etwa $^3/_4$ Stunden später. Er verzehrte hierauf den Rest des Abendessens und ging zur gewohnten Stunde (11 Uhr) zu Bett. Am nächsten Morgen grenzte er seinen Harn ab, und der Versuch wurde bis nach der Einnahme des Mittagessens in gewohnter Weise fortgeführt. Bald nach dem Essen erbrach Baudrexel einen Teil der Mahlzeit, und unter diesen Umständen war es natürlich nicht möglich, die Periode, wie beabsichtigt, zu Ende zu führen. Der N-Gehalt des Harnes am ersten Versuchstage wurde bestimmt.

Es wurden folgende Nahrungsmittel für die Versuchsreihe gewählt: 1. Roggenbrot aus der Versuchsbäckerei des Instituts für Getreideverwertung, 2. Leibniz-Kakes, 3. Reis, 4. Lachsschinken, 5. entbitterte Trockenhefe, 6. Milch, 7. Butter, 8. Schweizerkäse, 9. Kakao, 10. Zucker, 11. Zimt, 12. Himbeersaft, 13. Apfelmus, 14. Tee.

In sämtlichen Nahrungsmitteln wurden der N-Gehalt nach Kjeldahl und der Energiegehalt in der Berthelot-Mahlerschen Bombe direkt bestimmt, desgleichen in Harn und Faeces. Brot, Schinken, Milch (sterilisiert), Butter und Käse wurden bei einer Temperatur von ca. $+ 2^0$ C aufbewahrt und täglich nach Bedarf entnommen. Im Tee wurde der gelöste Anteil von 3 g Teeblättern auf seinen Trockensubstanz- und N-Gehalt untersucht. Bezüglich der Vorbereitung der Nahrungsmittel für die Analyse, die Probeentnahme usw. verweisen wir auf eine frühere Publikation.[1])

Was die Zubereitung der Speisen für die Mahlzeiten anbelangt, so wurden für das Frühstück 16 g Zucker und 8 g Kakao mit 300 ccm Wasser und ca. 300 ccm Milch aufgekocht. Zum Frühstück wurden etwa $^2/_3$ von dieser Portion mit ungefähr 40 g Kakes verzehrt. Der Rest des Kakaos und der Kakes (Tagesportion 70 g) wurde nachmittags zwischen $^1/_2 4$ und 4 Uhr eingenommen.

Der Reis (80 g) wurde mit 25 g Zimt-Zucker (aus einem Gemisch von 500 g Zucker und 30 g Zimt), ca. 0,5 g Kochsalz und 300 ccm Leitungswasser im strömenden Dampf 1 Stunde lang gar gekocht und nach Zusatz von ca. 100 ccm Milch (des Restes der täglichen Milchration von insgesamt 400 ccm) mit den 225 g Apfelkompott verzehrt.

---

[1]) W. Völtz, R. Förster und A. Baudrexel, Über die Verwertung des Bierextraktes und des Bieres im menschlichen und tierischen Organismus. Pflügers Archiv 134, 217, 1910.

Die Nahrungsmittel hatten folgenden N- und Calorien-Gehalt (im Mittel von mindestens 2 gut übereinstimmenden Analysen):

	Trocken-substanz %	Stickstoff %	Energiegehalt pro 100 g
1. Roggenbrot	67,30	0,936	275,30 Cal.
2. Kakes		1,123	438,15 „
3. Reis		1,261	376,75 „
4. Lachsschinken	35,66	3,324	175,84 „
5. Entbitterte Trockenhefe		8,552	452,05 „
6. Milch	11,69	0,500	63,757 „
7. Butter		0,141	779,70 „
8. Schweizerkäse		4,336	449,9 „
9. Kakao		3,432	583,45 „
10. Zucker		0,000	397,0 „
11. Zimt-Zucker (Gemisch von 500 g Zucker mit 30 g Zimt)		0,079	375,4 „
12. Himbeersaft	72,40	0,031	280,047 „
13. Apfelmus	27,70	0,049	91,301 „
Carmin (zur Abgrenzung der Faeces)		6,79	4,959 „

Die von B. täglich aufgenommene Wassermenge betrug inklusive des zur Zubereitung der Speisen verwandten Wassers (aber ohne den Wassergehalt der verzehrten Nahrungsmittel selbst) ca. 1750 bis 1800 ccm.

Die Faeces der einzelnen Perioden wurden mit gewogenen Mengen in Gelatinekapseln eingeschlossenen Carmins abgegrenzt. Die Abgrenzung geschah in folgender Weise:

An dem Abend vor Beginn des Versuches wurde um 7 Uhr die letzte Nahrung aufgenommen. 14 Stunden später, also um 9 Uhr vormittags des ersten Versuchstages wurde die abgewogene Menge Carmin während des Frühstücks heruntergeschluckt. Die Abgrenzung der Faeces gelang stets in einwandfreier Weise. Die Defäkation fand gewöhnlich einmal täglich, und zwar im Laufe des Vormittags statt. Der N- und Caloriengehalt der Gelatinekapseln mit dem eingeschlossenen Carmin war bestimmt worden und wurde von den betreffenden Daten der Faeces subtrahiert.

Der Harn wurde durch Entleerung der Blase unmittelbar vor Beginn jedes Versuchstages abgegrenzt. Die Wägungen wurden ebenfalls an jedem Morgen, und zwar unmittelbar nach der Harnentleerung und unmittelbar vor dem Frühstück ausgeführt.

Über die Nahrungsaufnahme und die Verteilung derselben auf die einzelnen Mahlzeiten der

Grundregimeperiode I

orientiert die folgende Übersicht.

Das Regime bestand morgens $8^1/_4$ Uhr aus

200 ccm Milch	m. 1,03 g N	u.	131,250 Cal.
11 g Zucker	„ 0,00 g N	„	43,670 „
5,3 g Kakao	„ 0,18 g N	„	31,117 „
40 g Kakes	„ 0,45 g N	„	175,260 „
	Sa. 1,66 g N	u.	Sa. 381,297 Cal.

vormittags 11 Uhr aus

70 g Himbeersaft mit 450 ccm Wasser	0,02 g N	u.	196,033 Cal.

mittags $12^1/_2$ Uhr aus

80 g Reis	m. 1,01 g N	u.	301,400 Cal.
100 ccm Milch	„ 0,52 g N	„	65,620 „
25 g Zimt-Zucker	„ 0,02 g N	„	98,850 „
225 g Apfelmus	„ 0,11 g N	„	205,427 „
	Sa. 1,66 g N	u.	Sa. 671,297 Cal.

nachmittags 4 Uhr aus

100 ccm Milch	m. 0,51 g N	u.	65,620 Cal.
5 g Zucker	„ 0,00 g N	„	19,850 „
2,7 g Kakao	„ 0,09 g N	„	15,559 „
30 g Kakes	„ 0,34 g N	„	131,445 „
	Sa. 0,94 g N	u.	Sa. 232,474 Cal.

abends $7^1/_2$ Uhr aus

010 g Lachsschinken	m. 3,32 g N	u.	175,840 Cal.
100 g Brot	„ 0,94 g N	„	275,300 „
50 g Butter	„ 0,07 g N	„	389,850 „
25 g Käse	„ 1,08 g N	„	112,475 „
Tee aus 3 g Teeblättern	„ 0,02 g N	„	ca. 0,5 „
30 g Zucker	„ 0,00 g N	„	119,100 „
	Sa. 5,43 g N	u.	Sa. 1073,065 Cal.

Sa. Summarum: 9,71 g N u. 2554,166 Cal.

Die Grundregimeperiode I dauerte vom 17./18. Nov. bis 21./22. Nov. 1910.

Die quantitative Sammlung des Harnes erfolgte an den 4 letzten, die der Faeces an den 3 letzten Versuchstagen. Zur Abgrenzung der Faeces dienten

1,3200 g Carmin mit 0,09 g N und 6,546 Calorien.

Tabelle I.

N-Umsatz und Ansatz während der Grundregimeperiode I.

Einnahme 9,71 g N.

Datum 1910	Es wurden ausgeschieden N						Es wurden resorbiert N		Der N-Ansatz betrug		Gewicht der Versuchsperson	Harnmengen cc.
	im Harn		im Kot		Summa							
Nov.	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	kg	ccm
17./18.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	66,53	—
18./19.	9,75	100,4	—	—	—	—	—	—	—	—	66,18	—
19./20.	9,90	102,0	1,94	19,98	11,84	121,9	7,77	80,02	— 2,13	— 21,94	65,62	1520
20./21.	9,41	96,91	1,94	19,98	11,35	116,8	7,77	80,02	— 1,64	— 16,89	65,00	1320
21./22.	10,54	108,5	1,94	19,98	12,48	128,5	7,77	80,02	— 2,77	— 28,53	65,42	1620
											64,80	
Sa.	39,60		5,82		37,67		23,31		6,54			
Also im Mittel von 4 resp. 3 Tagen:												
	9,90	102	1,94	20	11,84	122	7,77	80	— 2,13	— 22	65,59	1487

Pro Körperkilogramm und Tag hatte B. im Mittel 0,148 g N, hiervon 0,118 g resorbierbar, und 38,94 Cal. aufgenommen. Die Zahlen für den N-Gehalt des Harnes weisen keine großen Abweichungen auf. Es gelangten infolge eines zu geringen Eiweißgehaltes der Kost im Mittel pro die 0,19 g N mehr im Harn zur Ausscheidung bzw. in Harn und Kot 2,13 g N mehr, als die Nahrung enthielt. In dem Regime waren täglich nur 60,7 g Eiweiß ($N \times 6{,}25$) bzw., da das Eiweiß zu 80% als resorbierbar befunden wurde, 48,56 g verdauliches Eiweiß von der im Mittel 65,59 kg schweren Versuchsperson verzehrt worden. Die betreffenden Zahlen sind auf das Körperkilogramm berechnet: 0,925 g Eiweiß (brutto) bzw. 0,74 g Eiweiß (netto) und 35,17[1]) Calorien (netto).

Der mittlere tägliche Gewichtsverlust B.s betrug 346 g.

Energieumsatz:

Einnahmen pro die . . . . . 2554,166 Cal.

Ausgaben:

Der Kot der 3 Versuchstage wog getrocknet
110,91 g und lieferte pro Gramm . . . 4,323 „
also Summa . . . . . 479,467 „
ab für 1,3200 g Carmin . . . . . 6,546 „
also Summa . . . . . 472,921 Cal.
resp. pro die . . . 157,640 Cal. = 6,17% der Zufuhr
Der Harn enthielt 89,10 „ = 3,49% „ „
Sa. 246,740 Cal. = 9,66% der Zufuhr
= 246,740 Cal.

Somit beträgt der physiologische Nutzwert 2307,426 Cal. entsprechend 90,34% der Zufuhr.

[1]) Siehe unter den folgenden Daten für den Energieumsatz.

Pro Kilogramm Körpergewicht und Tag hatte B. 35,17 nutzbare Calorien erhalten.

$$\text{Calorischer Quotient } \left(\frac{\text{Harn Cal.} = 89{,}10}{\text{Harn N} = 9{,}90}\right) = 9{,}00.$$

Wenn wir schließlich den physiologischen Nutzeffekt der Kost unter der Annahme, daß während dieser Periode N-Gleichgewicht vorhanden gewesen wäre, berechnen, so ergibt sich folgendes:

Der tägliche N-Verlust des Organismus betrug im Mittel 2,13 g, der N-Gehalt des Harnes 9,90 g. Bei N-Gleichgewicht hätte der N-Gehalt des Urins also $9{,}90 - 2{,}13 = 7{,}77$ g N betragen. Da der calorische Quotient 9,00 war, so hätte der Harn bei N-Gleichgewicht $7{,}77 \times 9{,}0 = 69{,}93$ Cal. $= 2{,}74\,\%$ der Einnahme enthalten. Die Faeces lieferten eine Verbrennungswärme von 157,64 Cal. $= 6{,}17\,\%$ der Zufuhr. Somit hätte der physiologische Nutzeffekt der gesamten Kost bei N-Gleichgewicht $100 - (2{,}74 + 6{,}17) = 91{,}09\,\%$ betragen, eine Zahl, die von dem Wert $90{,}34\,\%$ nicht erheblich differiert, der bei einem täglichen N-Verlust des Organismus von 2,13 g direkt gefunden wurde.

II. Die Hefeperiode.

In unmittelbarem Anschluß an die Grundregimeperiode I folgte die 4tägige Hefeperiode II mit demselben Grundregime, wie in Periode I und einer Zulage von 100 g Trockenhefe pro die. Wir haben bereits in der Einleitung hervorgehoben, daß es uns bei dieser Periode darauf ankam, eine ziemlich beträchtliche Hefemenge zu verabreichen, so daß etwa die Hälfte des verdaulichen Eiweißes in Form von Hefe eingenommen werden sollte, um starke Ausschläge bezüglich der N-Bilanzen und des Energieumsatzes im Vergleich zu der zugehörigen Grundregimeperiode zu erhalten. Eine relativ große Hefemenge wurde auch aus dem Grunde genossen, um festzustellen, wie derartige Quantitäten vom Menschen vertragen werden; deshalb verzehrte B. auch das gesamte Hefequantum in relativ kurzer Zeit (ca. 1 bis 2 Stunden) hintereinander. Auf eine sorgfältige, küchenmäßige Zubereitung der Hefe war von uns Abstand genommen worden, weil wir vor Beginn der Versuchsreihe durch Kostproben festgestellt hatten, daß die Hefe ohne Schwierigkeit

in größeren Mengen genossen werden kann. Für den Stoffwechselversuch wurde die Hefe lediglich in Wasser aufgekocht und nach genügender Abkühlung mit Himbeersaft genossen.

Die uns für den Stoffwechselversuch zur Verfügung gestellte Hefe war auf folgende Weise entbittert worden. Die frische Hefe wurde mit viel Wasser aufgeschwemmt; nach jedesmaligem Absetzen der Hefe wurde das Wasser durch Dekantieren entfernt und so oft erneuert, bis dasselbe nur noch ganz schwach bitter schmeckte. Hierauf wurde die von dem überschüssigen Wasser befreite Hefe mit der gleichen Menge einer 2,5%igen Sodalösung aufgeschwemmt, die man ca. 1 Stunde bei Kellertemperatur (4 bis 6° C) auf die Hefe einwirken ließ. Die Sodalösung wurde hierauf abdekantiert und die Hefe wiederholt mit Wasser ausgewaschen. In der sehr verdünnten Lösung flockt die Hefe aus, wird klumpig und setzt sich ab. Nunmehr wurde die Hefe so lange mit Wasser ausgewaschen, bis das Natriumcarbonat vollständig entfernt war, und da das Präparat noch etwas bitteren Geschmack besaß, hatte man die ganze Prozedur nochmals wiederholt; jedoch war zum zweiten Male eine Sodalösung der halben Konzentration zur Verwendung gelangt. Schließlich war die Hefe in einer Temperatur von ca. 120 bis 130° getrocknet worden, und stellte so das für unseren Versuch benutzte Präparat dar.

Die entbitterte Trockenhefe enthielt:

6,87% Wasser,
93,13% Trockensubstanz,
7,04% Asche,
86,07% organische Substanz,
53,44% Rohprotein (N × 6,25),
50,04% Reineiweiß[1]),
3,12% Fett[2]),
1,44% Rohfaser,
28,09% N-freie Extraktstoffe.

Über die Nahrungsaufnahme und die Verteilung derselben auf die einzelnen Mahlzeiten der

Hefeperiode II

orientiert die folgende Übersicht:

---

[1]) Bestimmt nach der Methode von Barnstein, Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen, 54, 327, 1900.

[2]) Da die Ätherextraktionsmethode nach Soxhlet zu niedrige Werte für den Fettgehalt der Hefe liefert, wurde das Hefefett nach dem von dem einen von uns ausgearbeiteten Kugelmühlverfahren (siehe unter W. Völtz, Eine neue Methode zur Fettbestimmung, Arch. f. d. ges. Physiol. 97, 606 bis 633, 1903) bestimmt.

Das Regime bestand morgens $8^1/_4$ Uhr aus

200 ccm Milch .	m. 1,03 g N	u. 131,250 Cal.
11 g Zucker .	„ 0,00 g N	„ 43,670 „
5,3 g Kakao .	„ 0,18 g N	„ 31,117 „
40 g Kakes .	„ 0,45 g N	„ 175,260 „
	Sa. 1,66 g N	u. Sa. 381,297 Cal.

vormittags 10 bis 12 Uhr aus

100 g Trockenhefe . .	m. 8,55 g N	u. 452,05 Cal.
70 g Himbeersaft . .	„ 0,02 g N	„ 196,033 „
	Sa. 8,57 g N	u. Sa. 648,083 Cal.

mittags $12^1/_2$ Uhr aus

80 g Reis . .	m. 1,01 g N	u. 301,400 Cal.
100 ccm Milch .	„ 0,52 g N	„ 65,620 „
25 g Zimt-Zucker .	„ 0,02 g N	„ 98,850 „
225 g Apfelmus	„ 0,11 g N	„ 205,427 „
	Sa. 1,66 g N	u. Sa. 671,297 Cal.

nachmittags 4 Uhr aus

100 ccm Milch .	m. 0,51 g N	u. 65,620 Cal.
5 g Zucker .	„ 0,00 g N	„ 19,850 „
2,7 g Kakao .	„ 0,09 g N	„ 15,559 „
30 g Kakes .	„ 0,34 g N	„ 131,445 „
	Sa. 0,94 g N	u. Sa. 232,474 Cal.

abends $7^1/_2$ Uhr aus

100 g Lachsschinken	m. 3,32 g N	u. 175,840 Cal.
100 g Brot . .	„ 0,94 g N	„ 275,300 „
50 g Butter .	„ 0,07 g N	„ 389,850 „
25 g Käse . .	„ 1,08 g N	„ 112,475 „
Tee aus 3 g Teeblättern	„ 0,02 g N	„ ca. 0,5 „
30 g Zucker .	„ 0,00 g N	„ 119,100 „
	Sa. 5,43 g N	u. Sa. 1073,065 Cal.

Sa. Summarum: 18,26 g N u. 3006,216 Cal.

Die Hefeperiode II dauerte 4 Tage, und zwar vom 22./23. Nov. bis 25./26. Nov. 1910.

Zur Abgrenzung der Faeces dienten

1,3690 g Carmin mit 0,09 g N und 6,789 Calorien.

Tabelle II.

N-Umsatz und -Ansatz während der Hefeperiode II.
Einnahme: 18,26 g N.

Datum 1910	Es wurden ausgeschieden N						Es wurden resorbiert N		Der N-Ansatz betrug		Gewicht der Versuchsperson	Harnmengen ca.
	im Harn		im Kot		Summa							
Nov.	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	kg	ccm
22./23.	14,27	78,15	3,13	17,14	17,40	95,29	15.13	82,86	0,86	4,71	64,80	1290
23./24.	14,74	80,72	3,13	17,14	17,87	97,86	15,13	82,86	0,39	2,14	65,05	1310
24./25.	14,88	81,49	3,13	17,14	18,01	98,63	15,13	82,86	0,25	1,37	64,80	1380
25./26.	14,82	81,16	3,13	17,14	17,95	98,30	15,13	82,86	0,31	1,70	64,78 64,61	1540
Sa.	58,71		12,52		71,23							5520
Also im Mittel von 4 Tagen:												
	14,68	80,40	3,13	17,14	17,81	97,54	15,13	82,86	0,45	2,46	64,81	1380

Pro Körperkilogramm und Tag hatte B. 0,282 g N, hiervon 0,233 g resorbierbar, und 46,38 Calorien aufgenommen.

Die Zahlen für den N-Gehalt des Harnes stimmen an den einzelnen Versuchstagen gut überein. Die N-haltigen Nährstoffe wurden zu 82,86% resorbiert, also zu einem etwas höheren Prozentsatz als in der Grundregimeperiode (80,02%); es ergibt sich also für das Hefeeiweiß ein höherer Verdauungskoeffizient als für die Eiweißkörper, die das Grundregime enthielt. Die Berechnung des verdaulichen Anteils des Hefeeiweiß führt zu folgendem Ergebnis:

Die Faeces der Hefeperiode enthielten . . 3,13 g N
„ „ „ Grundregimeperiode enthielten 1,94 g N
Mehr in der Hefeperiode . . . . . 1,19 g N

Da 8,55 g N in Form von Hefe verabreicht worden waren, so ergibt die Auflösung der Proportion $8{,}55 : 100 = 7{,}36^{1}) : x$, daß das Hefeeiweiß (N × 6,25) zu 86,08% verdaulich ist. Dieser Wert stimmt mit dem von uns am Hunde (W. Völtz, l. c., Anmerkung 2 auf Seite 457) und an Hammeln (l. c., Seite 458, Anmerkung 2) ermittelten Zahlen (87% wurden vom Hunde, 88% von Hammeln resorbiert) befriedigend überein. Aus den geringen Abweichungen der Verdauungskoeffizienten für das Hefeeiweiß bei Carnivoren, Herbivoren und Omnivoren wäre

[1]) $8{,}55 - 1{,}19 = 7{,}36$.

übrigens auch abgesehen von der großen Übereinstimmung der Werte hinsichtlich einer verschiedenen Verdaulichkeit der Proteine bei verschiedenen Tierarten schon deshalb nichts zu schließen, weil es sich um drei verschiedene Hefepräparate handelt.

Was nun die N-Bilanzen während der vorliegenden Hefeperiode anbelangt, so bewirkte die Zulage von 53,44 g Protein in Form von Hefe zum Grundregime, daß 16,13 g Eiweiß weniger der Zersetzung anheimfielen, als während der Grundregimeperiode; denn während der Grundregimeperiode verlor der Organismus 2,13 g N von seinem Körperbestande, während der Hefeperiode setzte er 0,45 g N an, das ist eine Differenz von 2,58 g N zugunsten der Hefeperiode, entsprechend 16,13 g Eiweiß, das sind 30,2% des in Form von Hefe aufgenommenen Eiweißes, resp. 35% des verdaulichen Hefeeiweißes. Das Resultat dieser Versuchsreihe ist also für die Hefe ein sehr günstiges. Das Regime enthielt täglich 114,13 g Eiweiß (N × 6,25), resp. 94,56 g (82,86%) verdauliches Eiweiß, bzw. pro Körperkilogramm:

1,76 g Eiweiß (brutto), resp. 1,46 g Eiweiß (netto) und 41,15 Calorien[1]) (netto).

Nun wäre schließlich noch zu untersuchen, ob an den ersten Tagen der auf die Hefeperiode folgenden Grundregimeperiode der N-Gehalt des Harnes im Vergleich zu den späteren Tagen erhöht ist, d. h. also, ob nach Abschluß der Hefeperiode noch ein gewisser Anteil des Hefeeiweißes der Zersetzung anheimfällt. Das etwaige durch die Nachwirkung des aufgenommenen Hefeeiweißes bedingte Plus an Harnstickstoff wäre der Hefeperiode zur Last zu schreiben. Nun hat allerdings die abschließende Grundregimeperiode aus dem angeführten Grunde bereits am zweiten Tage abgebrochen werden müssen. Für den ersten Tag der Grundregimeperiode haben wir jedoch den Gehalt an Harnstickstoff bestimmt; derselbe betrug 10,02 g. Dieser Wert ist nur um 0,12 g N höher, als dem Durchschnittswert für die erste Grundregimeperiode entspricht (9,90), jedoch um 0,32 g N geringer, als der Gehalt an Harnstickstoff am letzten Tage der ersten Grundregimeperiode (10,34 g N). Wollten wir den Wert von 0,12 g N der Hefeperiode zurechnen, so würde der-

[1]) Siehe die im Anschluß an diese Ausführungen mitgeteilten Daten über den Energieumsatz während der Hefeperiode.

selbe, da die Hefeperiode 4 Tage dauerte, nur 0,03 g pro die betragen. Da die Anrechnung dieses Wertes die Resultate der Hefeperiode so gut wie gar nicht beeinflussen würde, können wir darauf verzichten, die 0,03 g N in Abzug zu bringen.

Das Gewicht Baudrexels blieb während der Hefeperiode annähernd gleich; er verlor täglich 50 g.

Energie-Umsatz:

Einnahmen pro die . . . . . 3006,216 Cal.

Ausgaben:

Der Kot der 4 Versuchstage wog getrocknet 216,4 g
und ergab pro g 3,948 Cal.
also Summa . 854,380 Cal.
ab für 1,3690 g
Carmin . . 6,789 Cal.
also Summa 847,591 Cal.
resp. pro die . 211,898 Cal. = 7,05 % der Zufuhr
Der Harn enthielt . . . 127,75 Cal. = 4,25 % der Zufuhr
Summa 339,648 Cal. = 11,30 % der Zufuhr = 339,648 Cal.

Somit beträgt der physiologische Nutzwert 2666,568 Cal. entsprechend 88,7 % der Zufuhr.

Von den 452,05 Calorien, die in Form von Hefe aufgenommen wurden, gingen, wie sich aus dem Vergleich dieser Periode mit der Grundregimeperiode I ergibt, 211,898 — 157,640 = 54,258 Cal., entsprechend 12 % der Zufuhr, in den Kot über. Es wurden also 88 % resorbiert.

Pro Kilogramm Lebendgewicht und Tag hatte B. 41,15 nutzbare Calorien erhalten.

$$\text{Calorischer Quotient } \left(\frac{\text{Harn Cal.} = 127{,}75}{\text{Harn} - \text{N} = 14{,}68}\right) = 8{,}7.$$

Für die Hefe berechnet sich als physiologischer Nutzeffekt aus den differenten Werten für den Energieumsatz der Hefeperiode und der zugehörigen Grundregimeperiode I die Zahl 79,45 (Harn und Faeces der Grundregimeperiode lieferten eine Verbrennungswärme von Sa. 246,740 Cal., der Hefeperiode von Sa. 339,648 Cal., also 92,908 Cal. mehr. Da der Energiegehalt der aufgenommenen Hefe 452,05 Cal. betragen hatte, so wurden

also 20,55% der Verbrennungswärme der Hefe in Harn und Faeces wiedererhalten, es betrug also der physiologische Nutzeffekt der Hefe 79,45% ihres Energiegehaltes). Diese direkt gefundene Zahl ist aber deshalb zu hoch, weil nur ein Teil des resorbierten Hefeeiweißes zu den einfachen N-haltigen Harnbestandteilen abgebaut worden war. Wir haben jedoch den physiologischen Nutzeffekt der Hefe für das N-Gleichgewicht zu berechnen, d. h. unter der Voraussetzung, daß der gesamte in Form von Hefeeiweiß resorbierte Stickstoff im Harn zur Ausscheidung gelangt.

Nun enthielt der Harn der

Grundregimeperiode I	9,90 g N	und	89,10 Cal.
Hefeperiode II	14,68 g N	„	127,75 „
also mehr in der Hefeperiode . .	4,78 g N	und	38,65 Cal.

Der calorische Quotient für den Hefestickstoff ist somit:

$$\frac{38{,}65}{4{,}78} = 8{,}086.$$

Die Faeces enthielten:

während der Grundregimeperiode I . .	1,94 g N,
„ „ Hefeperiode II	3,13 g N,
somit gingen von den verabreichten 8,55 g Hefe-N	1,19 g N

in den Kot über. Bei N-Gleichgewicht hätte der Harn 8,55 — 1,19 = 7,36 g N enthalten müssen. Da der calorische Quotient für den Hefestickstoff zu 8,086 ermittelt worden war, würden diesen 7,36 g N also 59,51 Cal. entsprechen. Zu diesen 59,51 Cal., die bei N-Gleichgewicht von dem Energiegehalt der aufgenommenen Hefe im Harn zu erwarten waren, ist zu addieren das Plus an Calorien, das in den Faeces der Hefeperiode II im Vergleich zu der Grundregimeperiode I ermittelt worden war, nämlich 54,258 Calorien, also Sa. 113,768 Cal. Da der Energiegehalt der aufgenommenen 100 g Hefe 452,05 Cal. betragen hatte, so ergibt sich als physiologischer Nutzeffekt für die Hefe, auf N-Gleichgewicht berechnet, die Zahl 74,83.

In den folgenden Tabellen III, IV und V bringen wir eine Übersicht über die Nahrungs-, die Eiweiß- und die Energiezufuhr, sowie über den Eiweißumsatz und -ansatz, den Energieumsatz usw. während der beiden vorliegenden Perioden.

Tabelle III.

Nummer der Periode	Bezeichnung der Periode	Mittl. Gew. der Versuchsperson kg	Nahrungsmittel g	Hierin N g	Es wurden täglich i. M. an N ausgeschieden: im Harn g	im Harn % der Einnahme	im Kot g	im Kot % der Einnahme	Summa g	Summa % der Einnahme	Es wurden resorbiert N g	Es wurden resorbiert N % der Einnahme	Der N-Ansatz betrug g	Der N-Ansatz betrug % der Einnahme	Mittlere tägl. Gewichtszunahme + / bzw. -abnahme g	Versuchsdauer Tage
I	Grundregime	65,59	Grundregime[1])	9,71	9,90	102	1,94	20	11,84	122	7,77	80	−2,13	−22	−346	3
II	Hefe	64,81	Grundregime +100 g Hefe	18,26	14,68	80,40	3,13	17,14	17,81	97,54	15,13	82,86	0,45	2,46	−50	4

Tabelle IV.

Nummer der Periode	Bezeichnung der Periode	N-Zufuhr insgesamt brutto	N-Zufuhr insgesamt netto	N-Zufuhr pro Kilogramm Gewicht brutto	N-Zufuhr pro Kilogramm Gewicht netto	Calorienzufuhr insgesamt brutto	Calorienzufuhr insgesamt netto	Calorienzufuhr pro Kilogramm Gewicht brutto	Calorienzufuhr pro Kilogramm Gewicht netto
I	Grundregime	9,71	7,77	0,148	0,118	2554,166	2307,4	38,94	35,17
II	Hefe	18,26	15,13	0,282	0,233	3006,216	2666,6	46,38	41,15

Tabelle V.

Nr. der Periode	Bezeichnung der Periode	Calor.-Zufuhr in d. Nahrung brutto	Calor.-Zufuhr in d. Nahrung netto	Im Harn Cal.	Im Harn % der Zufuhr	Caloriischer Quotient	Im Kot Cal.	Im Kot % der Zufuhr	In Harn und Kot Cal.	In Harn und Kot % der Zufuhr	Physiolog. Nutzwert Cal.	Physiolog. Nutzwert % der Zufuhr	Physiolog. Nutzwert der Hefezulage
I	Grundregime	2554,2	2307,4	89,10	3,49	9,0	157,640	6,17	246,740	9,66	2307,4	90,34	
II	Hefe	3006,2	2666,6	127,75	4,25	8,7	211,898	7,05	339,648	11,30	2666,6	88,7	direkt gefunden 79,45, auf N-Gleichgewicht berechn. 74,83

[1]) 100 g Brot, 70 g Kakes, 80 g Reis, 100 g Schinken, 400 ccm Milch, 50 g Butter, 25 g Käse, 8 g Kakao, 16 g Zucker, 25 g Zimt-Zucker (aus einem Gemisch von 500 g Zucker mit 30 g Zimt), 70 g Himbeersaft, 225 g Apfelmus und Tee aus 3 g Teeblättern.

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

Entbitterte Trockenhefe konnte vom Menschen in einer Quantität von 100 g innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes (ca. 1 bis 2 Stunden) ohne Schwierigkeiten nach einfachem Aufkochen genossen werden; die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus war in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen an Tieren eine sehr gute. Die Hefe ist durch einen hohen Eiweißgehalt, der bei dem verwendeten Präparat 53,4% betrug, ausgezeichnet; etwa die Hälfte des Nahrungseiweißes wurde in Form von Hefe aufgenommen. Die Zufuhr von 53,4 g Hefeeiweiß bewirkte, daß 16,13 g Eiweiß weniger der Zersetzung anheimfielen als während der Grundregimeperiode; das sind 30,2% des in Form von Hefe aufgenommenen Eiweißes, bzw. 35% des verdauten Hefeeiweißes.

Das Hefeeiweiß wurde zu 86% resorbiert, somit enthielt das Präparat 46% verdauliches Eiweiß. Die Calorien der Hefe waren zu 88% resorbierbar. Der physiologische Nutzeffekt der Hefe betrug, auf das Stickstoffgleichgewicht berechnet, 74,8% ihres Energiegehaltes.

Somit ist die Hefe den konzentriertesten und speziell den eiweißreichsten Nahrungsmitteln zuzurechnen.

Untersuchungen über den Purinstoffwechsel.

V. Mitteilung.

Über das Verhalten der Purinbasen der Muskeln während der Arbeit.

Von

Vittorio Scaffidi.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie d. k. Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 26. Dezember 1910.)

Die innigen Beziehungen zwischen Muskelarbeit und Purinkörperausscheidung weisen mit Bestimmtheit darauf hin, daß der Purinbasenstoffwechsel des Muskelgewebes während der Arbeitsleistung des letzteren mehr oder minder großen Veränderungen unterliegt.

Es ist bekannt, wie die Ausscheidung der Harnsäure und der Purinbasen durch Muskelarbeit beeinflußt wird. Die Untersuchungen von Burian[1]), Kennaway[2]) und Scaffidi[3]) haben diesbezüglich übereinstimmend ergeben, daß:

1. während der Arbeit sich keine Vermehrung der ausgeschiedenen Harnsäuremenge zeigt;

2. nach beendeter Muskeltätigkeit stets eine mehr oder weniger starke Zunahme der Harnsäurcausscheidung eintritt;

3. die Purinbasenausfuhr schon während der Muskeltätigkeit (Burian, Scaffidi) und auch noch nach Beendigung derselben (Scaffidi) ansteigt;

4. diese Schwankungen der Purinkörperausscheidung von einer Veränderung im Muskelstoffwechsel abhängig sind (Burian, Scaffidi) und nur bei sehr großen Anstrengungen auch von einer vermehrten Zerstörung der Nucleoproteide anderer Gewebe herrühren (Scaffidi).

---

[1]) Burian, Zeitschr f. physiol. Chem. 43.

[2]) Kennaway, Journ. of Physiol. 28.

[3]) Scaffidi, Bickels Beiträge z. Pathol. u. Therapie der Ernährungsstörungen 2, 1910.

Direkte Beobachtungen über das Verhalten der Purinbasen in den Muskeln während der Arbeit sind von Monari[1]) mitgeteilt worden, der bei seinen Versuchen über die Menge des Kreatins und Kreatinins bei Ermüdung der Muskeln auch die quantitative Bestimmung des Xanthins und des Hypoxanthins vorgenommen hat. Sichere Schlüsse lassen sich jedoch aus Monaris Versuchen nicht ziehen, einmal, weil nicht in allen seinen Experimenten auf das Verhalten im ruhenden Muskel Bezug genommen ist und weil sich ferner seine Analysen auf Xanthin und Hypoxanthin beschränken und die anderen Purinkörper unberücksichtigt bleiben. Es ist überdies bekannt, daß eine gesonderte Bestimmung jener Stoffe nie wirklich quantitativ sein kann, was besonders bei Versuchen mit unerheblichen Schwankungen ein großer Übelstand ist.

Sehr schöne Untersuchungen hat vor einiger Zeit Burian[2]) angestellt, der bei Hunden mit Hilfe von Durchströmungsversuchen die Wirkung der Muskelermüdung auf das Verhalten der Purinkörper studierte und sodann die Purinkörper (Harnsäure und Gesamt-Purinbasen-N) sowohl in der Durchströmungsflüssigkeit, wie in den gereizten und ruhenden Muskeln bestimmte.

Die Hauptergebnisse, zu denen Burian gelangte, sind:

1. Die ruhenden Muskeln bilden unaufhörlich aus den in ihnen enthaltenen Purinstoffen Harnsäure, die aber durch die Durchströmungsflüssigkeit weggeschwemmt wird.

2. Während der Reizung geben die Muskeln an das durchströmende Serum eine größere Menge Purinkörper ab als während der Ruhe.

3. Bei Arbeitsleistung wächst auch der Purinbasengehalt (Hypoxanthingehalt) in den Muskeln.

Nach Burians Auffassung ist dieses Hypoxanthin synthetischen Ursprunges und ausschließlich auf den Metabolismus der Muskeln zurückzuführen.

Die folgenden Experimente wurden an Muskeln von Fröschen und Kröten vorgenommen, und zwar aus verschiedenen Gründen:

1. können die Muskeln dieser Tiere sehr lange gereizt werden, bevor bei ihnen Erschöpfung eintritt, so daß sich die mühsame künstliche Zirkulation erübrigt;

2. bleiben auf diese Weise die Stoffwechselprodukte in den Muskeln erhalten und können leicht und vollständig analysiert werden;

3. reizt man bei dieser Versuchsanordnung bestimmte Muskelgruppen der einen Körperhälfte, während man die entsprechenden der anderen Seite im Ruhezustand hält, und so

---

[1]) Monari, Annali di chimica e di farmacologia, Serie 4, 10.

[2]) Burian, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.

hat man ohne weiteres das genaueste Kontrollmaterial zur Hand.

Ich führte meine Versuchsreihe im Frühjahr aus und benutzte die hinteren Extremitäten von Fröschen und Kröten. Jeder Versuch wurde wie folgt eingeleitet:

20 bis 35 Tiere wurden geköpft und jedem das eine Hinterbein, samt seinen Muskeln, durch Exartikulation des Hüftgelenkes als Kontrollmaterial entnommen. Diese Kontrollextremitäten wurden teils gleich zur Untersuchung herangezogen, teils blieben sie während der Versuchsdauer auf einem Porzellanteller, in einer kleinen Menge ihres Blutserums und mit einem in Serum getränkten Filtrierpapier zugedeckt liegen.

Das andere Hinterbein blieb am Becken, das zum Zwecke der Reizung in eine kleine Pinzette geklemmt wurde. Sämtliche Pinzetten der verschiedenen Präparate waren untereinander mit einem Kupferdraht verbunden, der an den einen Pol der sekundären Spule eines Induktoriums angeschlossen war, während der andere Pol mit einem Messingstab in Verbindung stand, auf dem die Glieder ruhten. In den primären Kreis des Induktoriums war zur Erzielung rhythmischer Reize ein Metronom eingeschaltet.

Gewöhnlich wurden die Muskeln zu Beginn des Versuches erst mit Einzelschlägen und sodann tetanisch gereizt. Die Zahl der Reizungen schwankte zwischen 20 bis 40 in der Minute, manchmal betrugen sie aber am Ende des Versuches auch 60 pro Minute. Während der Arbeitsleistung wurden die Muskeln mit einem Streifchen Filtrierpapier bedeckt, das entweder mit dem Serum der Tiere oder mit Ringerscher Lösung angefeuchtet war. Nach jedem Versuche wurde der Gehalt an Purinbasen-N und Harnsäure, sowohl in den Arbeits-, wie in den Ruhemuskeln ermittelt. Die Muskeln wurden hierzu von den Knochen getrennt, fein zerkleinert, in einer großen Menge Wassers (1500 ccm) gekocht und leicht mit Essigsäure angesäuert. Hierauf wurde die Brühe heiß filtriert und im Filtrat der N-Gehalt der Purinbasen und die Harnsäure bestimmt. Der Rückstand wurde 10 Stunden lang mit $^1/_2$%iger Schwefelsäurelösung gekocht und nach der bekannten Methode von Burian und Walker Hall zur Bestimmung des N der Purin-

basen weiter behandelt. Es wurden also bei jedem Experiment in den Arbeits-, wie in den Ruhemuskeln bestimmt:

1. die Menge des N der Purinbasen, die sich beim Kochen des Muskelbreies im Wasser lösen. Dieser Wert wird als Wert der „freien" Purinbasen bezeichnet;

2. die Menge des N der Purinbasen die im Rückstande des gekochten Muskelbreies nach Abfiltrieren der Flüssigkeit zurückbleiben und die an die Nucleine gebunden sind, also kurz der N der „gebundenen" Purinbasen;

3. die Harnsäure.

Vers. 1. Verwendet wurden die, nach obiger Beschreibung vorbereiteten, hinteren Extremitäten von 20 Fröschen. Die Hälfte des Materiales wurde während 2 Stunden gereizt und zwar so, daß etwa 40 tetanische Reize in der Minute die Muskelgruppen trafen und sodann 4 Stunden lang mit tetanischen Reizungen pro Minute. Jede dieser Reizungen dauerte nur einen Bruchteil einer Sekunde, entsprechend der Dauer des Metronomschlusses.

Nach je $^1/_2$stündiger Arbeitsleistung wurden die Muskeln während 5 bis 10 Minuten ruhen gelassen. Am Ende des Versuches aber wurde die Reizung ohne Unterbrechung bis zur völligen Erschöpfung der Muskeln fortgesetzt.

Die chemischen Analysen zeigen folgende Resultate:

Gewicht der „Arbeitsmuskeln": 47 g
N der „freien" Purinbasen im Filtrat: 0,004 g
N der „gebundenen" Purinbasen im Rückstand: 0,1419 g
Gesamt-Purinbasen-N: 0,1459 g

Harnsäure: ∅.

Gewicht der „Ruhemuskeln": 51 g
N der „freien" Purinbasen im Filtrate: 0,4[1]) mg
N der „gebundenen" Purinbasen im Rückstand: 18,88 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 19,28 mg

Harnsäure: ∅.

Vers. 2. Es wurden die Hinterbeine von 32 Fröschen verwendet, wovon wiederum die Hälfte gereizt wurde und zwar diesmal 4 Stunden lang mit 40 Induktionsschlägen pro Minute; nach jeder $^1/_2$ Stunde Arbeit erfolgte, wie in Vers. 1, 5 Minuten Ruhepause; zuletzt während 1 Stunde 20 tetanische Reizungen von je 1 Sekunde Dauer.

a) Gewicht der Arbeitsmuskeln . . 75 g
N der „freien" Purinbasen . . . 2,38 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 20,86 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 23,24 mg

Harnsäure: ∅.

[1]) Bei diesen beiden Bestimmungen erfolgte die Trennung der „freien" Purinbasen, indem man den Muskelbrei in 500 ccm Wasser = 25%ige Schwefelsäurelösung für 24 Stunden auf Eis hielt.

b) Gewicht der Ruhemuskeln . . . 77 g
N der „freien" Purinbasen . . 2,31 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 25,20 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 27,51 mg
Harnsäure: ∅.

Vers. 3. Es wurden die Hinterbeine von 35 Fröschen verwandt. Die Hälfte derselben arbeitet während 2 Stunden mit 40 Einzelschlägen pro Minute. Dann während 1 Stunde mit 20 tetanischen Reizungen pro Minute.

a) Gewicht der Arbeitsmuskeln . . 79 g
N der „freien" Purinbasen . . 3,92 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 21,52 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 25,4 mg
Harnsäure: ∅.

b) Gewicht der Ruhemuskeln . . 84,5 g
N der „freien" Purinbasen . . 2,8 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 26,74 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 29,54 mg
Harnsäure: ∅.

Vers. 4. Benützt werden die Hinterbeine von 20 Kröten. Die „Arbeitsmuskeln" werden während 5 Stunden mit 60 Induktionsschlägen pro Minute gereizt; sodann werden 2 Stunden lang pro Minute 20 tetanische Reize gesetzt.

a) Gewicht der Arbeitsmuskeln . . 88 g
N der „freien" Purinbasen . . 2,52 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 16,94 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 19,46 mg
Harnsäure: ∅.

b) Gewicht der Ruhemuskeln . . . 92 g
N der „freien" Purinbasen . . . 2,1 mg
N der „gebundenen" Purinbasen . 18,9 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 21 mg
Harnsäure: ∅.

Vers. 5. Die Hinterbeine von 20 Kröten dienen als Versuchsmaterial. Die Ruhemuskeln werden sogleich analysiert. Die Arbeitsmuskeln werden während 6 Stunden mit 100 Induktionsschlägen pro Minute und sodann 2 Stunden lang mit 40 tetanischen Reizen pro Minute gereizt.

a) Gewicht der Arbeitsmuskeln . . . 94 g
N der „freien" Purinbasen . . 2,17 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 13,86 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 16,03 mg
Harnsäure: ∅.

b) Gewicht der Ruhemuskeln . . . 96 g
N der „freien" Purinbasen . . 2,38 mg
N der „gebundenen" Purinbasen 17,08 mg
Gesamt-Purinbasen-N: 19,46 mg
Harnsäure: ∅.

Nach dem Vorstehenden betrug die Gesamtdauer der Reizung in minimo (Experiment III) $3^1/_2$ Stunden, in maximo (Experiment V) $8^1/_2$ Stunden. Die Muskeln waren am Ende des Versuches in einigen Fällen (Experiment I, III, V) vollkommen erschöpft, so daß sie selbst nach einer Ruhepause von einigen Minuten nicht mehr zu reagieren vermochten; in anderen Fällen (Experiment II und IV) waren sie dagegen noch reaktionsfähig.

Ein regelmäßig wiederkehrendes Ergebnis sämtlicher Experimente ist, daß sowohl in den „Arbeits-" wie in den „Ruhe-" Muskeln die Harnsäure stets vollkommen fehlt. Dagegen sind im Purinbasengehalt ganz konstante Unterschiede zu konstatieren, wie sich aus der folgenden Tabelle ergibt, in welcher der in den verschiedenen Versuchen erhaltene Purinbasen-N auf Prozente umgerechnet erscheint.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Versuchsmaterial	Arbeitsmuskeln		Ruhemuskeln
		Reizdauer in Stunden	Purinbasen-N %	Purinbasen-N %
1	Frösche	6	0,0298	0,0338
2	„	5	0,0312	0,0357
3	„	3	0,0320	0,035
4	Kröten	7	0,0191	0,0223
5	„	8,40′	0,0168	0,0202

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß der Purinbasen-N-Gehalt beim Frosch in den „Ruhemuskeln" 0,0338 bis 0,0357%, in den „Arbeitsmuskeln" 0,032 bis 0,0298%, bei den Kröten dagegen in „Ruhemuskeln" 0,0202 bis 0,0223% und in den „Arbeitsmuskeln" 0,0191 bis 0,013% beträgt. Es wurde also bei jedem Versuche eine Verminderung der Purinbasen in den ermüdeten Muskeln nachgewiesen und zwar in folgendem Ausmaße:

bei Vers. 1 eine Verminderung der Purinbasen um 12%
„ „ 2 „ „ „ „ „ 13 „
„ „ 3 „ „ „ „ „ 9 „
„ „ 4 „ „ „ „ „ 15 „
„ „ 5 „ „ „ „ „ 17 „

Es bezieht sich das auf den Gesamtburinbasen-N, d. h. auf die Summe freier und gebundener Basen. Meine Analysen erlauben mir aber auch eine gesonderte Betrachtung dieser beiden Gattungen. Freilich ist zu bemerken, daß die Scheidung derselben keine ganz scharfe sein kann, denn es läßt sich nicht ausschließen, daß beim Kochen kleine Mengen der gebundenen Basen abgespalten werden. Da jedoch der Fehler in allen Fällen, sowohl bei den Ruhe- als auch bei den Arbeitsmuskeln in derselben Richtung liegt, so hat der Vergleich immerhin einen gewissen Wert. Die Resultate der gesonderten Bestimmung der freien und gebundenen Purinbasen sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Arbeitsmuskeln		Ruhemuskeln	
	N der „freien" Purinbasen %	N der „gebundenen" Purinbasen %	N der „freien" Purinbasen %	N der „gebundenen" Purinbasen %
2	0,0032	0,0280	0,0030	0,0327
3	0,0050	0,0270	0,0030	0,0320
4	0,0028	0,0191	0,0023	0,020
5	0,0023	0,0145	0,0024	0,0178

Aus dieser Tabelle ist vor allem ersichtlich, daß in den ruhenden Muskeln eine große Einförmigkeit des Gehaltes an freiem Purinbasen-N besteht. In den beiden am Frosch ausgeführten Bestimmungen beträgt derselbe 0,003% und 0,003% (Vers. 2 und 3), bei den Kröten 0,0023% und 0,0024% (Vers. 4 und 5).

Bei den Arbeitsmuskeln hingegen ist der Basen-N (außer in Vers. 5) regelmäßig etwas erhöht. Diese Zunahme der freien Purinbasen tritt speziell bei Vers. 3 hervor, in dem der freie Purinbasen-N der Ruhemuskeln 0,003%, jener der Arbeitsmuskeln 0,005% ausmacht. Daraus geht hervor, daß die Verminderung des Gesamt-Purinbasengehaltes in den Muskeln nach der Arbeit einzig auf die Abnahme der gebundenen Purinbasen zurückzuführen ist.

Die Resultate meiner Untersuchungen lassen sich also folgendermaßen zusammenfassen:

1. In den quergestreiften Muskeln des Frosches und der Kröte ist der Purinbasengehalt niedriger als in den Muskeln

der Säugetiere — bei welche letzteren man 0,06 bis 0,07% Purinbasen-N[1]) festgestellt hat — und auch geringer als bei Fischen[2]), bei denen ungefähr dieselben Werte gefunden worden sind.

2. Der Gesamt-Purinbasengehalt der Muskeln von Fröschen und Kröten sinkt bei der Arbeit um ein erhebliches, im Maximum 17%.

3. Diese Abnahme beruht lediglich auf einer Verminderung der gebundenen Basen, während die freien Basen bei der Muskelarbeit mehr oder weniger unverändert bleiben oder sogar etwas ansteigen.

4. Bei Frosch und Kröte findet sich bei den hier eingehaltenen Versuchsbedingungen weder in den Ruhe- noch in den Arbeitsmuskeln Harnsäure.

5. Diese letztere Tatsache mag zurückzuführen sein, entweder darauf, daß beim Nucleinabbau die Stufe der Harnsäure gar nicht durchlaufen wird, oder aber darauf, daß ein stark wirksames uricolytisches Ferment im Muskel existiert, das die gebildete Harnsäure sofort wieder zerstört.

---

[1]) Burian und Walker Hall, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38.

[2]) Scaffidi, diese Zeitschr. 25.

Trypsin und Pankreasnucleoproteid.

Von

Leonor Michaelis und Heinrich Davidsohn.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban.)

(Eingegangen am 10. Dezember 1910.)

Teil I:

Der isoelektrische Punkt des Trypsins und das Flockungsoptimum seiner Lösungen.

Die vor kurzem mitgeteilten Bestimmungen des isoelektrischen Punktes am Albumin von Michaelis und Rona[1]) sowie am Pepsin von Michaelis und Davidsohn[2]) haben uns gezeigt, daß diese Bestimmungen mit geeigneter Methodik viel genauer möglich sind, als in den ersten Untersuchungen über die Wanderung der Fermente vorausgesehen werden konnte. Wir wandten uns deshalb nunmehr zu der genauen Feststellung der isoelektrischen Konstante des Trypsins, die entsprechend dem damaligen Stande der Methodik in einer früheren Arbeit von Michaelis[3]) nur ganz roh geschätzt werden konnte.

Daß wir hier schlechtweg vom Trypsin als einem einheitlichen Körper sprechen, während doch nach der Auffassung von Pawlow eine Zweiteiligkeit wahrscheinlich ist, dazu liegt nicht ohne weiteres eine Berechtigung vor. Unsere Untersuchungen beziehen sich aber durchweg, soweit das nicht besonders angegeben ist, auf das Pankreatinum purissimum (Rhenania), und von diesem Präparat werden wir, um das gleich vorweg zu nehmen, in folgendem erweisen, daß es einen durch eine physikalisch-chemische Konstante scharf charakteri-

[1]) Leonor Michaelis und Peter Rona, diese Zeitschr. 27, 38, 1910.

[2]) Leonor Michaelis und Heinrich Davidsohn, diese Zeitschr. 28, 1, 1910.

[3]) L. Michaelis, diese Zeitschr. 16, 486, 1909.

sierten Körper enthält, an dem die tryptische Wirkung dieses Präparates haftet. Diesen Körper haben wir im Auge, wenn wir vom Trypsin sprechen.

Überführungsversuche mit Trypsin.

1. Einleitung.

Die Überführungsversuche boten beim Trypsin größere Schwierigkeiten als beim Pepsin. Schon bei Festlegung der Konzentration, in der die Fermentlösung verwendet werden sollte, waren einige Punkte zu berücksichtigen, die erst nach einer größeren Zahl von Vorversuchen klargestellt werden konnten.

Es kommt nämlich bei unseren Versuchen darauf an, eine gewisse Zone von Wasserstoffionenkonzentrationen zu finden, innerhalb deren die Wanderung des Ferments nicht deutlich einsinnig ist. Diese Zone muß möglichst eingeengt werden, da dann die Bestimmung des isoelektrischen Punktes am genauesten ausfällt.

Am rationellsten wäre es deshalb, unter gleichzeitiger Berücksichtigung unserer früheren Erfahrungen, für uns gewesen, eine solche Fermentkonzentration zu finden, bei der eine Stromdauer von 4 bis 6 Stunden genügt hätte, um einwandfrei eine Zone doppelsinniger Wanderung zu bestimmen. Dahingehende Versuche mißglückten aber. Um bei so kurzen Wanderungszeiten überhaupt deutliche Ausschläge zu bekommen, mußten wir starke Fermentlösungen benutzen.

Starke Lösungen mit kurzer Stromdauer anzuwenden, ist jedoch nicht ratsam. Denn es können dann durch mechanische Erschütterungen beim Ansetzen des Versuchs merkliche Spuren des Ferments in die Seitenräume gelangen; diese mechanischen Fehlerquellen werden aber bei kurzem Stromdurchgang nicht wieder ausgeglichen. Deshalb sind geringere Fermentkonzentrationen vorzuziehen. Auf der anderen Seite verlangen diese aber zur Erzielung guter Ausschläge längeren Stromdurchgang, und die längere Stromdauer schließt die Gefahr in sich, daß die durch die hinzugefügten Regulatoren festgelegte Wasserstoffionenkonzentration schließlich doch merklich verändert wird. Da aber dieses letzte Bedenken geringer zu veranschlagen war als das erste, entschieden wir uns bei Ansetzung unserer Hauptreihe für 18stündigen Stromdurchgang bei 110

Volt. Durch Probieren fanden wir ferner als günstigste Bedingung, das Ferment in 0,4%iger Lösung anzuwenden; bei stärkeren Fermentkonzentrationen wurde die Zone doppelsinniger Wanderung verbreitert. Die Fermentlösung wurde vor dem Versuch 24 Stunden gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser im Eisschrank dialysiert.

2. Der Überführungsapparat.

Wir möchten bei dieser Gelegenheit die Erfahrungen des letzten Jahres bezüglich der einzelnen Teile des Überführungsapparates im Zusammenhang mitteilen. Als Apparat benutzten wir wie früher den in Anlehnung an Pauli und Landsteiner konstruierten.

a) Die Anode.

Die Silberanode in gesättigter Kochsalzlösung hat sich uns andauernd als absolut einwandfrei erwiesen und dürfte keiner Anfechtung begegnen. Sie verhindert das Auftreten saurer Reaktion an der Anode in idealer Weise, wie unsere Messungen bei den einzelnen Versuchen zeigen werden.

Bei langem Stromdurchgang und hohem Elektrolytgehalt der leitenden Flüssigkeiten kommt es mitunter vor, daß die Elektrode aufgebraucht wird, resp. an irgendeiner Stelle zerbröckelt. Man muß also dafür sorgen, daß die Masse des Silbers, aus dem die Elektrode besteht, nicht zu gering und der Elektrolytgehalt der Flüssigkeiten nicht zu groß ist. Das entstehende Chlorsilber hat die sehr angenehme Eigenschaft, an der Anodenseite festgehalten zu werden, weil die Chlorsilberteilchen offenbar gegen die Lösung ein negatives Potential besitzen. Zuweilen tritt jedoch der Übelstand ein, daß das entstehende unlösliche Silbersalz eine kathodische Kataphorese zeigt und in das Seitengefäß gelangt. Die Bedingungen, unter denen dies geschieht, sind uns noch nicht ganz klar. Wir möchten indessen folgende Beobachtung erwähnen. In einigen früheren Versuchen, in denen der Überführungsapparat mit Phosphatgemischen beschickt war, zeigte das entstehende unlösliche Silbersalz, besonders, wenn wir als depolarisierendes Salz nicht Kochsalz, sondern konzentriertere Phosphatgemische anwendeten, eine kathodische Kataphorese. Es handelt sich in diesen Fällen um Silberphosphat; dieses zeigt also häufig

kathodische Kataphorese und wandert in das Seitengefäß. Solche Versuche müssen natürlich stets verworfen werden. Wir glauben, daß solche Vorkommnisse bis zu gewissem Maße durch sehr reichliche Zufügung von festem Kochsalz vermieden werden können.

b) Die Kathode.

Als Kathode benutzten wir stets einen mit Ausschluß seiner beiden Enden paraffinierten Kupferdraht, der in eine nicht allzu starke Lösung von Kupferchlorid taucht. Pauli[1]) hat behauptet, daß die Kupferelektrode erstens überflüssig, zweitens schädlich sei. Überflüssig, weil eine gewöhnliche Platinelektrode ohne jeden Zusatz dieselben Dienste leiste. Das können wir durch folgende Versuche sehr einfach widerlegen.

Versuch 1. Anode: Silber in starker Kochsalzlösung. — Kathode: Kupfer ohne Zusatz von Kupferchlorid. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und essigsaurem Natrium im Verhältnis 1:10. Die Normalität an Natriumacetat beträgt $^1/_{20}$. — Mittelgefäß: 0,4% Lösung von Trypsin in demselben Essigsäuregemisch.

[H'] berechnet $= 1{,}8 \cdot 10^{-4}$.

[H'] gemessen nach 18stündigem Stromdurchgang:

a) Anode $= 1{,}6 \cdot 10^{-10}$,
b) Kathode $= 5{,}8 \cdot 10^{-13}$,
c) Mitte $= 7{,}1 \cdot 10^{-13}$.

Versuch 2. Anordnung wie Vers. 1.

[H'] gemessen nach 18stündigem Stromdurchgang:

a) Anode $= 4{,}3 \cdot 10^{-10}$,
b) Kathode $= 9{,}6 \cdot 10^{-13}$,
c) Mitte $= 9{,}3 \cdot 10^{-13}$.

Versuch 3. Anordnung wie bei Vers. 1, nur mit dem Unterschied, daß das Essigsäuregemisch diesmal $^1/_{50}$ normal an Natriumacetat ist.

[H'] gemessen nach 18stündigem Stromdurchgang:

a) Anode $= 2{,}3 \cdot 10^{-11}$,
b) Kathode $= 4{,}6 \cdot 10^{-13}$,
c) Mitte $= 1{,}0 \cdot 10^{-13}$.

Versuch 4. Anode und Kathode wie in den vorigen Versuchen. An Stelle des Essigsäuregemischs wird eine $^n/_{20}$-Natriumacetatlösung ohne freie Essigsäure verwendet.

[H'] berechnet = annähernd neutral (zwischen 10^{-7} und 10^{-8}).

[H'] gemessen nach 18 stündigem Versuch:

a) Anode $= 3{,}5 \cdot 10^{-10}$,
b) Kathode $= 2{,}2 \cdot 10^{-12}$,
c) Mitte $= 6{,}3 \cdot 10^{-12}$.

---

[1]) Pauli und Wagner, diese Zeitschr. 27, 299, 1910, Fußnote.

Vergleicht man die kolossalen Veränderungen der ursprünglichen Reaktion, wie sie diese Versuche dokumentieren, mit den geringen Änderungen bei Anwendung von Kupferchlorid als Depolarisator, wie die folgenden Verauchsprotokolle zeigen werden, so erübrigt sich eine weitere Auseinandersetzung darüber, ob unsere Kupferelektrode „überflüssig" ist.

Zweitens, so behauptet Pauli, ist der Kupferchloridzusatz schädlich, weil dieses Salz durch Diffusion in das Seitengefäß gelangen könnte. Uns ist dieses Vorkommnis nur gelegentlich passiert, und selbstverständlich wurden solche Versuche stets verworfen. Gerade um den Eintritt dieses Vorkommnisses leicht erkennen zu können, wählten wir als Depolarisator Kupferchlorid und nicht Zinckchlorid, da man den Übertritt von Kupfer leicht an der Farbe erkennen kann. Die Ursache, warum Kupferionen im allgemeinen nicht in die Seitengefäße gelangen, ist darin zu suchen, daß erstens der Diffusionsweg des Kupfers bis zum Seitengefäß mehrere Zentimeter lang ist und außerdem über eine Steigung führt, wodurch die Konvektion ausgeschlossen wird und nur die reine Diffusion übrig bleiben könnte. Außerdem wird die Diffusion der Kupferionen durch die Wirkung des Stromes rückgängig gemacht, da diese kathodisch, also vom Seitengefäß fort sich bewegen. Der Zusatz des Kupferchlorids kann überdies in ziemlich geringer Menge erfolgen.

c) Die Flüssigkeiten.

Als Seitenflüssigkeiten benutzten wir Regulatorgemische, und zwar bei den Trypsinversuchen hauptsächlich Acetatgemische. Die Konzentration an Natriumacetat wurde in der Regel zwischen $^1/_{40}$ und $^1/_{200}$ normal gehalten, und die Menge der Essigsäure dementsprechend bemessen.

Die Mittelflüssigkeit unterschied sich von den Seitenflüssigkeiten nur durch den Gehalt an Ferment.

3. Die Wasserstoffionenkonzentration vor und nach dem Stromdurchgang.

Es fragt sich nun, inwieweit es wirklich gelungen ist, mit Hilfe dieser Anordnung die zu Anfang des Versuchs willkürlich hergestellte Wasserstoffionenkonzentration bis zum Schluß konstant zu halten. Um dies zu kontrollieren, wurde in zahlreichen

Versuchen nach dem 18stündigen Stromdurchgang die H-Ionenkonzentration der Mittelflüssigkeit und oft auch die der Seitenflüssigkeiten mit Gasketten nachgemessen. Die einzelnen Zahlen sind aus den später folgenden Versuchsprotokollen ersichtlich. Das allgemeine Resultat ist folgendes: So befriedigend wie bei den nur 4 bis 6 Stunden währenden Pepsinversuchen war die Aufrechterhaltung der H-Ionenkonzentration nicht, und zwar fand die Änderung hier immer in dem Sinne statt, daß die Mittelflüssigkeit etwas saurer wurde. Meistens war die eintretende Säuerung nur gering; jedenfalls ist der Erfolg dieser Bestrebungen im Vergleich zu früheren Versuchen sehr bedeutend. Denn andere Autoren haben aus Mangel an geeigneter Methodik sich nicht gescheut, zwischen einer H-Ionenkonzentration von 10^{-8}, allenfalls 10^{-4}, bis zur Neutralität, also 10^{-7}, überhaupt keine Abstufungen mehr vorzunehmen, während doch gerade hier das Bereich ist, in dem sich alle für den Physiologen wichtigen Dinge abspielen.

Kurz erwähnt sei hier noch eine Beobachtung, die wir bei Gelegenheit der später zu beschreibenden Versuche mit Milchsäuregemischen gemacht haben. Wir nahmen für diese Versuche den Zusatz von Kupferchlorid sehr gering, ohne ihn allemal genau gleich zu wählen. Dabei zeigte sich, daß [H˙] nach 22stündigem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit entweder genau gleich dem berechneten Werte oder eine Spur alkalischer war, während in den anderen Versuchen mit reichlichem Zusatz von Kupferchlorid der entsprechende Wert, wie erwähnt, nach der sauren Seite schwankte. Der durch den Stromdurchgang verursachte Fehler der Alkalisierung der Mittelflüssigkeit wird also durch Kupferchloridzusatz gut kompensiert und zeigt sich in gewissen Grenzen abhängig von der Menge dieses Salzes.

4. Die Überführungsversuche.

Die Wanderung der Fermente wurde in der Weise geprüft, daß 3 ccm der auf Fermentgehalt zu untersuchenden Flüssigkeiten mit 5 ccm 2,5 $^0/_{00}$iger Caseinlösung (die 2 $^0/_{00}$ Soda enthielt) vermischt und unter Zusatz einiger Tropfen Lackmustinktur als Indicator auf schwach alkalische Reaktion mittels Essigsäure resp. Soda gebracht wurde. Die Verdauung ging im Thermostaten von 37° vor sich. In Zwischenräumen von

15 bis 30 Minuten wurden Proben entnommen und nach Zusatz von 1 bis 2 Tropfen Natronlauge das unverdaute Casein durch Essigsäure ausgeflockt. Eine Änderung des Resultates fand nur innerhalb der ersten 60 Minuten statt, obwohl wir die Verdauung stets 90 bis 120 Minuten unterhielten.

Versuch 1 bis 4 siehe S. 484.

Wanderung dieser 4 Versuche: anodisch.

Versuch 5. Anode: Silber in Kochsalz. — Kathode: Kupfer in Kupferchlorid. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und Natriumacetat = 1 : 5; Normalität an Natriumacetat: $^1/_{40}$. — Mittelgefäß: 0,4% Fermentlösung in demselben Gemisch.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $3{,}6 \cdot 10^{-6}$.

Wanderung (nach 18stündigem Stromdurchgang): anodisch.

Versuch 6 und 7. Anordnung und Resultat wie Versuch 5.

Versuch 8. Anode: Silber in Kochsalz. — Kathode: Kupfer in Kupferchlorid. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und essigsaurem Natrium = 1 : 1; Normalität an Natriumacetat = $^1/_{200}$. — Mittelgefäß: 0,4% Fermentlösung im gleichen Gemisch.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $1{,}8 \cdot 10^{-5}$.

Wanderung: anodisch.

Versuch 9 = Versuch 8.

Versuch 10. Anode, Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und essigsaurem Natrium = 5 : 1. — Mittelgefäß: 0,4% Fermentlösung im gleichen Gemisch.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $9{,}0 \cdot 10^{-5}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $2{,}4 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch.

Versuch 11. Anordnung wie Versuch 10.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $9{,}0 \cdot 10^{-5}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $3{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch.

Versuch 12. Anordnung wie Versuch 10.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $9{,}0 \cdot 10^{-5}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $2{,}6 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch.

Versuch 13. Anordnung wie Versuch 10.

$[H^{\cdot}]$ berechnet = $9{,}0 \cdot 10^{-5}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $2{,}4 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch-kathodisch.

Versuch 14. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und essigsaurem Natrium = 10 : 1; Normalität an Natriumacetat = $^1/_{200}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 1{,}8 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 2{,}6 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch-kathodisch.

Versuch 15. Anordnung wie Versuch 14.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 1{,}8 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 1{,}8 \cdot 10^{-3}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 16. Anordnung wie Versuch 14.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 1{,}8 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 2{,}5 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 17. Anordnung wie Versuch 14.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 1{,}8 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 2{,}6 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 18. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Essigsäure und essigsaurem Natrium = 20 : 1; Normalität an Natriumacetat $= {}^1/_{200}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 3{,}6 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 3{,}6 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 19. Anordnung wie Versuch 18.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 3{,}6 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 8{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 20. Ohne Depolarisator auf der Kathode, sonst Anordnung wie Versuch 18.

$[H^{\cdot}]$ berechnet $= 3{,}6 \cdot 10^{-4}$.

$[H^{\cdot}]$ nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen $= 5{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Die isoelektrische Zone des Trypsins liegt also nach unseren Versuchen in dem Bereich von H-Ionenkonzentrationen, die nach der Berechnung aus dem Verhältnis von Essigsäure zu Acetat $0{,}9 \cdot 10^{-4}$ bis $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ betragen. Die nachträglich erfolgenden Messungen ergaben zwar, wie die Versuchsprotokolle zeigen, mehr oder minder geringe Abweichungen nach der sauren Seite hin; jedoch ist zu bedenken, daß diese Abweichungen

erst während des Stromdurchganges ganz allmählich eingetreten sind. Wir glauben, diesen Abweichungen am besten dadurch Rechnung zu tragen, daß wir nicht die gemessenen, sondern die berechneten Zahlen der Betrachtung zugrunde legen und im Auge behalten, daß wir damit wahrscheinlich einen kleinen Fehler machen. Infolge dieses Fehlers wird der wahre isoelektrische Punkt bei einer etwas höheren Acidität liegen. Nehmen wir das arithmetische Mittel aus den oben genannten Grenzwerten, so bekommen wir als berechneten isoelektrischen Punkt des Trypsins eine H'-Ionenkonzentration von $1{,}35 \cdot 10^{-4}$, einen Wert, der also wahrscheinlich etwas zu klein ist.

Wir haben nachträglich noch eine zweite Reihe von Überführungsversuchen angestellt, in denen wir als Regulator ein Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron wählten. Diese Versuche sollten dazu dienen, die Zone der doppelsinnigen Wanderung, die sich in der ersten Versuchsreihe auf 2 Versuche beschränkt, zu verbreitern. In diesen Versuchen betrug der Stromdurchgang 21 Stunden. Zur Erläuterung der folgenden Protokolle sei vorausgeschickt, daß bei doppelsinniger Wanderung die schwächere mit eckigen Klammern versehen ist.

Versuch 21. Anode: Silber in Kochsalz. — Kathode: Kupfer in Kupferchlorid. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 5 : 1; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{200}$. — Mittelgefäß: 0,4% Fermentlösung in demselben Gemisch.

[H'] berechnet = $6{,}70 \cdot 10^{-4}$.

[H'] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $3{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-[anodisch].

Versuch 22 = Versuch 21.

[H'] berechnet = $6{,}7 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch.

Versuch 23. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 3 : 1; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{100}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

[H'] berechnet = $4{,}0 \cdot 10^{-4}$.

[H'] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $4{,}2 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-[anodisch].

Versuch 24 = Versuch 23.

[H'] berechnet = $4{,}0 \cdot 10^{-4}$.

[H'] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $3{,}4 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 25. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 2 : 1; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{200}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

[H·] berechnet = $2{,}7 \cdot 10^{-4}$.

[H·] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $1{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-[anodisch].

Versuch 26 = Versuch 25.

[H·] berechnet = $2{,}7 \cdot 10^{-4}$.

[H·] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $1{,}2 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 27. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 1 : 1; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{100}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

[H·] berechnet = $1{,}35 \cdot 10^{-4}$.

[H·] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $1{,}3 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 28 = Versuch 27.

[H·] berechnet = $1{,}35 \cdot 10^{-4}$.

[H·] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $1{,}2 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 29. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 1 : 2; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{100}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

[H·] berechnet = $0{,}7 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 30 = Versuch 29.

Wanderung: kathodisch-anodisch.

Versuch 31. Anode und Kathode wie vorher. — Seitengefäße: Gemisch von Milchsäure und milchsaurem Natron = 1 : 5; Normalität an Natriumlactat = $^1/_{100}$. — Mittelgefäß: 0,4% Ferment im gleichen Gemisch.

[H·] berechnet = $0{,}3 \cdot 10^{-4}$.

[H·] nach dem Stromdurchgang in der Mittelflüssigkeit gemessen = $1{,}0 \cdot 10^{-4}$.

Wanderung: anodisch-[kathodisch].

Versuch 32 = Versuch 31.

Wanderung: anodisch-[kathodisch].

Die isoelektrische Zone ist in dieser Versuchsreihe viel breiter als in der ersten ausgefallen, wohl lediglich infolge des

um 3 Stunden längeren Stromdurchgangs. Der isoelektrische Punkt läßt sich nach diesen Versuchen auf 1 bis $2 \cdot 10^{-4}$ schätzen, stimmt also befriedigend mit dem oben angegebenen Wert überein.

Das Flockungsoptimum des Trypsins.

Aus den Arbeiten von Michaelis und Rona[1]) geht hervor, daß manche Eiweißkörper schon im genuinen Zustand beim isoelektrischen Punkt ausflocken. Da wir nun gelegentlich unserer Überführungsversuche beobachtet hatten, daß die Trypsinlösungen in der Nähe des isoelektrischen Punktes Trübungen, später Flockungen zeigten, so gingen wir daran, mittels der in der Arbeit von Michaelis und Rona angegebenen Methodik das Flockungsoptimum des Trypsins zu bestimmen.

Der im Überführungsversuch gefundene isoelektrische Punkt des Trypsins liegt so, daß er am bequemsten mit Milchsäuregemischen ($K = 1{,}35 \cdot 10^{-4}$) erreicht werden kann, aber nicht viel schlechter auch mit Acetatgemischen ($K = 1{,}8 \cdot 10^{-5}$). Wir haben beide Gemische in Anwendung gebracht und haben mit ihnen das Flockungsoptimum in Reihen zu bestimmen gesucht, in denen die H-Ionenkonzentration in geometrischer Progression ansteigt. Die Resultate waren unabhängig von der Art des angewendeten Regulators. Der Exponent wurde zunächst größer, dann kleiner gewählt und vor allem stets auf die Konstanz des Salzgehaltes Wert gelegt. Da schon wegen des Eiweißgehaltes der Fermentlösung nicht angenommen werden konnte, daß in den einzelnen Röhrchen die aus dem Verhältnis von Säure und Salz berechnete H-Ionenkonzentration absolut mit der wirklich vorhandenen übereinstimmt, wurden die Röhrchen mit optimaler Flockung meistens noch mit Konzentrationsketten auf ihren Gehalt an H-Ionen gemessen. Die folgenden Zahlen werden zeigen, daß die Differenz zwischen berechneter und gemessener H-Ionenkonzentration nur sehr gering ist. In Tabelle I ist ein derartiger Versuch unter Anwendung von Milchsäuregemischen wiedergegeben. Die geometrische Reihe hat den Exponenten 0,8.

Bei der Ansetzung dieser Reihen haben sich uns nicht unbeträchtliche Schwierigkeiten entgegengestellt, die wir erst allmählich zu überwinden gelernt haben. Wir kamen bald zu

[1]) L. Michaelis und P. Rona, l. c.

Tabelle

	1	2	3	4	5	6	7
Wasser	2,20	2,66	0,82	1,56	2,15	2,62	3,00
n/2-Milchsäure	2,30	1,84	—	—	—	—	—
n/5-Milchsäure	—	—	3,68	2,94	2,35	1,88	1,50
n/10-Natriumlactat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1%ige Pankreatinlösung	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Sofort	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe
Nach 4 Minuten	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe
„ 8 „	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	+
„ 13 „	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	+	+
„ 17 „	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	+	+
„ 25 „	trübe	trübe	trübe	+	+	+	++
„ 40 „	+	+	+	++	++	++	++

der Überzeugung, daß die in den Resultaten auftretenden Unstimmigkeiten von zufälligen Verschiedenheiten der zugesetzten Pankreatinlösung abhängig waren; wir haben deshalb schließlich, um diese Fehlerquellen aufzudecken, die zugesetzte Pankreatinlösung, was Herstellung und Menge betrifft, verschiedentlich variiert, während wir die Reihe der Milchsäuregemische stets konstant ließen. Das Schema für derartige Versuche bildet gleichfalls Tabelle I. Die übrigen unterscheiden sich also von ihm lediglich durch das Volum des zugesetzten Pankreatinfiltrates und seine Herstellungsweise.

Im Laufe der Versuche zeigte es sich zunächst als wichtig, ein absolut klares Filtrat herzustellen. Milchig getrübte Filtrate zeigten den isoelektrischen Punkt regelmäßig zu sauer an. Es ist möglich, daß die Trübung von einem verunreinigenden amphoteren Stoff herrührt, dessen stärker saure isoelektrische Reaktion die Verschiebung bedingen könnte.

Um gleichmäßige Filtrate zu erlangen, haben wir die Aufschwemmung in einem kleinen Schüttelapparat bei Zimmertemperatur vorgenommen. 5 Minuten bis 1 Stunde lang geschüttelte Aufschwemmungen verhielten sich gleich, sofern das Filtrat klar war.

Die Aufschwemmung wurde stets 1%ig gewählt. Die zu jedem Röhrchen zugesetzte Menge betrug in den einzelnen Reihen 1 bis 5 ccm. Bei Reihen mit 1 und 3 ccm Zusatz

I.

8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3,30	3,54	3,73	3,89	4,01	4,11	4,19	4,25	4,30	4,34	4,37
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,20	0,96	0,77	0,61	0,49	0,39	0,31	0,25	0,20	0,16	0,13
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe	Spur	Spur	klar
trübe	+[1]	+	+	+	+	trübe	trübe	trübe	trübe	trübe
+	+	+	++	+	+	+	trübe	trübe	trübe	trübe
+	+	++	++	++	+	+	+	+	trübe	trübe
+	++	++	+++	++	++	+	+	+	+	+
++	+++	+++	beste Zusammenballung	+++	++	++	++	++	+	+
+++	++++	++++	++++ Optimum	++++	++++	+++	+++	+++	++	++

waren die Flockungen übereinstimmend und deutlich zu erkennen, hingegen verwischten sich die Unterschiede bei Reihen mit Zusatz von 5 ccm Pankreatinlösung.

Die Reihen wurden nach dem Ansetzen 2 bis 3 Stunden dauernd beobachtet und auftretende Unterschiede sofort notiert.

Da wir ferner beobachtet hatten, daß das klare Filtrat einer Aufschwemmung, die mehrere Tage auf Eis gestanden hatte, zwei Flockungsoptima zeigte, von denen das eine mit dem der übrigen Versuche übereinstimmte, während das andere bei einer erheblich saueren Reaktion lag, so wurden frische Aufschwemmungen und Filtrate verwendet. Eine Erklärung für dieses Phänomen werden wir später zu geben versuchen.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen erwähnten Kautelen haben wir eine Reihe Versuche angestellt, die in einwandfreier Weise ein Flockungsoptimum beobachten ließen. In Anbetracht des kleinen Exponenten, mit dem die Reihe angesetzt war, gaben wir uns auch dann zufrieden, wenn zwischen 2 bis 3 benachbarten Röhrchen auch bei guter Beobachtung nicht unterschieden werden konnte. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen dem berechneten und gemessenen Wert für $[H^{\cdot}]$ mögen folgende Zahlen dienen, die von optimal geflockten Röhrchen verschiedener Versuchsreihen herrühren:

[1]) + bedeutet Flockung; die Zahl dieser Zeichen gibt den Grad der Flockung an.

[H·] berechnet $\times 10^{-4}$	[H·] gemessen $\times 10^{-4}$
2,7	2,2
3,3	2,8
3,9	2,5
5,1	3,1
3,9	3,8
2,7	2,6
3,9	4,5
3,3	3,2
2,7	1,3
3,9	2,4

Zur Feststellung des Koagulationsoptimum haben wir die gemessenen Werte zugrunde gelegt unter Hinzunahme folgender Zahlen, die aus Versuchen ohne kontrollierende Messungen stammen:

[H·] berechnet $\times 10^{-4}$
2,4
3,3
2,7
2,1
1,7
1,7
2,1
3,3
2,7

Aus diesen 19 Werten haben wir das Flockungsoptimum der Pankreatinlösung zu $2{,}6 \cdot 10^{-4}$ berechnet.

Schlußfolgerungen.

Die Übereinstimmung zwischen dem bei der Überführung gefundenen isoelektrischen Punkt des Trypsins (etwas größer als $1{,}35 \cdot 10^{-4}$) und dem Flockungsoptimum der verwendeten Lösung ($2{,}6 \cdot 10^{-4}$) ist so auffallend, daß wir sofort an einen Zusammenhang zwischen dem Trypsin und dem ausflockenden Körper denken müssen. Da nun Michaelis und Rona bereits an mehreren amphoteren Elektrolyten die Identität zwischen isoelektrischem Punkt und Koagulationsoptimum experimentell

gezeigt und theoretisch begründet haben, so ist für uns die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß der ausflockende Körper das Trypsin darstellt.

Teil II.

Versuch zur Reindarstellung des Trypsinfermentes.

Wenn wir in der oben erwähnten Flockung wirklich das tryptische Ferment zu sehen haben, so würden wir jetzt die Möglichkeit besitzen, das Trypsin in gereinigtem Zustande darstellen zu können.

Um aber die Wahrscheinlichkeit unserer Annahme noch zu erhöhen, müssen wir zeigen, daß die Flockung tatsächlich tryptische Wirksamkeit besitzt, und daß sie den größten Teil des in der Lösung enthaltenen Ferments darstellt.

Zu dem Zwecke vermischten wir eine größere Menge einer 1%igen filtrierten Trypsinlösung (Pankreatin Rhenania) mit so viel Milchsäure und milchsaurem Natron, wie es dem optimal geflockten Röhrchen der Tabelle I entsprach. Der entstehende Niederschlag wurde scharf abzentrifugiert, unter Zusatz einiger Tropfen 20%iger Sodalösung in destilliertem Wasser gelöst und auf das Volumen der zur Flockung verwendeten Trypsinlösung aufgefüllt. Fermentlösung, Flockung und Mutterlauge wurden dann auf schwach alkalische Reaktion gebracht und, wie Tabelle II es zeigt, in ihrer tryptischen Wirksamkeit verglichen. Als Verdauungssubstrat wurde ebenso wie bei den Überführungsversuchen eine 2,5‰ige Caseinlösung verwendet.

Tabelle II.

Fermentlösung	2,5‰iges Casein	Dest. Wasser	Resultat nach 12 Minuten, wobei die Fermentlösung repräsentiert wird durch:		
			1%iges Pankreatin	Flockung	Mutterlauge
1,0	5,0	—	verdaut	verdaut	verdaut
0,5	5,0	0,5	„	„	fast verdaut
0,25	5,0	0,75	fast verdaut	fast verdaut	0
0,12	5,0	0,88	halb „	Teil „	0
0,06	5,0	0,94	0	0	0
0,03	5,0	0,97	0	0	0

Aus Tabelle II geht hervor, daß ein kleiner, aber nicht mehr sicher meßbarer Unterschied im Trypsingehalt des „Pankreatins" und der aus ihm gewonnenen Fällung besteht, während die Mutter-

lauge ungefähr nur noch $^1/_4$ des Ferments enthält. Es dürfte also schätzungsweise unsere Fällung 75%, auf alle Fälle aber mehr als 50% des gesamten Trypsins enthalten. Da die Ausbeute des fällbaren Körpers sicher nicht maximal ist (der Elektrolytgehalt der Lösung vermindert auch hier, wie beim Albumin und Globulin, die völlige Ausbeute der Fällung im isoelektrischen Punkt,[1]) so ist der Trypsingehalt der Fällung als sehr hoch zu veranschlagen. Wir sind deshalb der Überzeugung, daß wir auf dem oben beschriebenen Wege die Möglichkeit haben, das Trypsinferment in ziemlich reiner Form zu gewinnen.

Die chemischen Eigenschaften des gereinigten Trypsins.

Zur Anstellung der folgenden Untersuchungen haben wir uns eine größere Menge der Flockung auf oben beschriebenem Wege hergestellt und nach dem Zentrifugieren bei niederer Temperatur im Luftstrom getrocknet. Man gewinnt auf diese Weise ein leicht braun gefärbtes, nicht hygroskopisches Pulver, das sich in schwacher Sodalösung leicht und restlos löst. Später haben wir durch nochmaliges Umfällen und Trocknen ein farbloses, entschieden reineres Präparat gewonnen.

Unser Präparat zeigt im Gegensatz zum Pankreatin und zur Mutterlauge keine Biuretreaktion, d. h. es wird auf Zusatz von Lauge und einem Tropfen dünner Kupfersulfatlösung sofort blau. Auch Mays[2]) hatte schon durch Fällung des Pankreasextraktes mit Magnesium- oder Ammonsulfat gelegentlich, aber nicht in immer reproduzierbarer Weise, ein biuretfreies Trypsin dargestellt. Dagegen zeigt es eine positive Pentosenreaktion (Orcin-Salzsäure) ebenso wie das ursprüngliche Präparat. Ferner wird unser Präparat aus seiner Lösung beim Kochen koaguliert und gibt mit Sulfosalicylsäure eine dicke Flockung, mit Essigsäure-Ferrocyankalium eine Trübung.

Wir haben im vorhergehenden gezeigt, daß aus einer 1%igen Pankreatinlösung mindestens 50% des Fermentes in unsere Flockung übergeht. Um nun eine Vorstellung von der Wirksamkeit unseres Präparates im Vergleich zur ursprüng-

[1]) Vgl. Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 27, 49, 1910.
[2]) Karl Mays, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 428, 1903.

lichen Pankreatinlösung zu bekommen, haben wir von den Lösungen, die zu dem in Tabelle II wiedergegebenen Versuch verwendet wurden, bestimmte Teile abgemessen und zu Trockenrückstand- und Aschenbestimmungen verwendet. Dabei ist zu berücksichtigen, daß von dem als Pankreatinum purissimum in den Handel gebrachten Präparat nur ein kleiner Teil in die wässerige Lösung übergeht, wie man sich bei jedem diesbezüglichen Versuch überzeugen kann.

1. 1%ige filtrierte Pankreatinlösung:
6,9491 g gaben 0,0348 g Trockensubstanz und 0,0024 g Asche.
Mithin enthält 1 g der Lösung 0,0050 g aschefreie Trockensubstanz.
2. Flockung (gelöst im gleichen Volumen):
6,8069 g gaben 0,0026 g Trockensubstanz und 0,0012 g Asche.
Mithin enthält 1 g Lösung 0,00039 g Trockensubstanz.

Unser Niederschlag stellt also weniger als den zehnten Teil der Trockensubstanz der Ausgangslösung dar.

Betreffs der verdauenden Wirksamkeit unseres Präparates können wir noch folgende Angaben machen: 0,06 ccm einer 400fachen Verdünnung in 1 ccm Volumen ist gerade imstande, 5 ccm einer 2,5‰igen Caseinlösung während einer Stunde bei 37° völlig zu verdauen. Obige Menge entspricht 0,15 mg Substanz. Zwei zu verschiedenen Zeiten hergestellte Präparate zeigten genau die gleiche fermentative Kraft gegenüber der Caseinlösung.

Von elementaranalytischen Daten sei vorläufig nur der P-Gehalt von 1,7% erwähnt.

Sowohl der chemischen Zusammensetzung nach wie besonders der Fällungsmethode nach — denn es handelt sich um eine „Säurefällung" — ist nun unser Trypsin identisch mit dem α-Nucleoproteid des Pankreas, das Hammarsten[1]) darstellte. Wenn auch unsere Fällungsmethode bessere Ausbeute gibt und die alte einfache Essigsäurefällung an Sicherheit erheblich übertrifft, so ist doch im Prinzip unser Körper derselbe wie der von Hammarsten. Es ist sehr interessant, was Hammarsten von seinem α-Nucleoproteid sagt. Er findet, daß ihm viel Trypsin „anhaftet", daß das Nucleoproteid daher in reinem Zustande nicht zu gewinnen sei, und er beschäftigt sich mit ihm deshalb nicht näher und wendet seine ganze Auf-

[1]) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 19, 1893.

merksamkeit dem durch Kochen aus ihm abgespaltenen β-Nucleoproteid zu.

Die Worte von Hammarsten[1]) sind von diesem Gesichtspunkt aus so interessant, daß wir sie zitieren wollen:

„Man kann nun fragen, warum ich das Proteid β, das ja nur ein Spaltungsprodukt, und nicht die Muttersubstanz desselben, das Proteid α, studiert habe. . . Der wichtigste Grund war . . der, daß die Reindarstellung des Proteides α mit so großen Schwierigkeiten verbunden ist, daß . . die Ausbeute daran gar zu gering wird. Eine äußerst schwer zu entfernende Verunreinigung ist der Blutfarbstoff und ein anderer Farbstoff, der . . entsteht. Eine andere Verunreinigung ist das Trypsin. Das Proteid α wirkt nämlich so ungemein kräftig verdauend, daß ich nach keiner Methode ein kräftiger wirkendes Trypsin habe herstellen können, und es war deshalb auch sogar fraglich, ob das Proteid α als Trypsin zu betrachten wäre. Auf Grund . . der Untersuchungen von Kühne . . glaube ich indessen eine solche Annahme zurückweisen zu müssen, obwohl ich durch eigene Versuche noch keine Klarheit in dieser Frage gewonnen habe."

Man sieht, welche Schwierigkeiten Hammarsten bezüglich der Ausbeute und Reinheit hatte, weil er eben einfach bei einer, wie wir jetzt sagen können, schlecht definierten „Acidität" arbeitete, und die Bedingungen der optimalen Fällung und der Vermeidung störender Nebenfällungen noch nicht erkannt hatte.

Auch wir könnten zu der Meinung gelangen, daß das Trypsin unserer Fällung nur anhafte, und die von uns eruierten optimalen Fällungsbedingungen nur das Nucleoproteid beträfen, während das Trypsin von dem Niederschlag einfach mitgerissen werde. Dafür scheint sogar die Tatsache zu sprechen, daß der Niederschlag, der aus dem Extrakt von ganz frischem, nicht autolysiertem Rinderpankreas und aus Leichenpankreas auf ganz entsprechende Weise vom Menschen erhalten wurde, fast kein „Trypsin" enthält, oder wenigstens keine tryptische Wirkung hat. Andererseits ist aber in den Fällen, wo der Pankreasextrakt als solcher tryptisch gut wirksam ist, beinahe das gesamte Trypsin in dem an Masse so winzigen Niederschlag enthalten, und der elektrische Umkehrpunkt des „Trypsins" entspricht genau dem Koagulationsoptimum des „α-Nucleoproteids". Unmöglich ist das ein Zufall, und die Annahme, das Trypsin werde von der Fällung nur mitgerissen, ist unter solchen Umständen kaum denkbar. Man würde kaum ein Adsorbens finden, das in so geringer Menge so enorme Mengen Trypsin mitreißt. Wir wissen keine

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 33, 1894.

andere Erklärung für diese höchst auffällige Erscheinung als folgende: Das Nucleoproteid und das Trypsin sind äußerst nahe miteinander verwandt, so nahe, daß die isoelektrischen Konstanten beider einander gleich sind. Das Trypsin stellt irgend eine im Wesen unbekannte, in chemischer Beziehung sehr nahe verwandte Modifikation des Nucleoproteids dar. Auch Friedenthal hat die Nucleoproteid-Natur von Fermenten behauptet und auch darauf hingewiesen, daß man die Nucleoproteide andererseits ohne fermentative Eigenschaften gewinnen kann; was wir aber neu hinzufügen können, ist die Identität der isoelektrischen Konstanten des Nucleoproteids und des Trypsins. Dieses „Nucleoproteid" wird also durch unsere Fällung isoliert, und wenn es im Zustande der tryptischen Aktivität in dem jeweils bearbeiteten Pankreasextrakt vorhanden ist, so ist es auch im gefällten Zustand tryptisch aktiv; ist es aber im ganz oder teilweise tryptisch unwirksamen Zustand vorgebildet, so ist auch die Fällung frei oder fast frei von tryptischer Wirkung. Eine andere Erklärung ist nicht imstande, das von uns gefundene Tatsachenmaterial unter einen Gesichtspunkt zu vereinigen.

Über das β-Nucleoproteid.

Da das von Hammarsten als β-Nucleoproteid bezeichnete Abbauprodukt der Pankreasdrüse gleichfalls mit der Methode der Säurefällung dargestellt wird, war es von vornherein wahrscheinlich, daß wir auch für diesen Körper ein Flockungsoptimum mit der von uns vorher angegebenen Methodik würden feststellen können. In der Tat ist es uns, wie wir gleich näher beschreiben werden, gelungen, das Optimum der Koagulation für das β-Nucleoproteid ziemlich genau zu bestimmen.

Die Untersuchung gerade dieser Frage hatte für uns ein besonderes Interesse. Zunächst können wir auf diese Weise zwei ziemlich nahe verwandte Eiweißkörper mittels einer leicht zu gewinnenden physikalischen Konstante in exakter Weise definieren und demgemäß auch differenzieren. Außerdem gewinnt jetzt die von uns vorher gezeigte Übereinstimmung zwischen dem isoelektrischen Punkt des Trypsins und dem Flockungsoptimum des äußerst stark tryptisch wirksamen α-Nucleoproteids (unter der Voraussetzung der Identität von isoelektrischem Punkt und Flockungsoptimum) noch eine neue

Bedeutung, d. h. es gewinnt die Ansicht, daß α-Nucleoproteid und Trypsin sehr nahe verwandt sind, eine neue Stütze.

Zur Ansetzung der Versuche für die Feststellung der optimalen Koagulation der β-Nucleoproteids haben wir teils Milchsäuregemische verwendet, teils Gemische von Chloressigsäure und chloressigsaurem Natron. Die Konstante für die Chloressigsäure ist $K = 1{,}55 \cdot 10^{-3}$; diese Gemische bieten also eine angenehme Erweiterung des Gebietes, das wir mit Regulatoren erreichen können. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß chloressigsaures Natron nicht haltbar ist, weil die Chloressigsäure in alkalischer Lösung sich zersetzt. Man muß sich infolgedessen das Salz stets frisch herstellen oder, was bequemer ist, man vermischt erst im Reagensröhrchen die Chloressigsäure mit der berechneten Menge Natronlauge. Die Anordnung einer so angesetzten Reihe zeigt Tabelle III.

Tabelle III.

	1	2	3	4	5	6	7
[H'] ber.	$1{,}7 \cdot 10^{-2}$	$8{,}4 \cdot 10^{-3}$	$4{,}2 \cdot 10^{-3}$	$2{,}1 \cdot 10^{-3}$	$1{,}55 \cdot 10^{-3}$	$7{,}8 \cdot 10^{-4}$	$3{,}9 \cdot 10^{-4}$
$^2/_5$-Chloressigsäure	4,25	2,25	1,25	0,75	—	—	—
$^2/_{10}$-Chloressigsäure	—	—	—	—	2,0	1,5	1,35
$^2/_{10}$-Natronlauge . .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Wasser . .	—	2,0	3,0	3,5	2,25	2,75	2,90
β-Nucleoproteid .	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Um innerhalb 1 bis 2 Stunden deutliche Flockungen und Zusammenballung beobachten zu können, hat es sich als nötig erwiesen, das β-Nucleoproteid aus einer $2\,\%$igen Pankreatinlösung, sonst aber nach den Angaben von Hammarsten durch Kochen und Filtrieren darzustellen. Von dem klaren Filtrat haben wir zu jedem Röhrchen 5 ccm hinzugefügt.

Auf Grund von 5 Versuchen wurde das Flockungsoptimum zu $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ für das β-Nucleoproteid gegenüber $2{,}6 \cdot 10^{-4}$ für das α-Nucleoproteid berechnet.

Der Umstand, daß die isoelektrische Reaktion des β-Nucleoproteids viel saurer ist als die des α-Proteids, bietet eine Erklärung für das erwähnte Auftreten eines zweiten, bei höherer

Acidität liegenden Optimums in Aufschwemmungen, die einige Zeit auf Eis gestanden haben. Es kann sich hier um die Flockung von durch Autolyse entstandenem β-Nucleoproteid handeln.

Wir haben schließlich noch in einem orientierenden Versuche den bei der Darstellung des β-Nucleoproteids abgespaltenen und koagulierten Eiweißkörper untersucht. Zu diesem Zwecke haben wir ihn abzentrifugiert, unter Zusatz von etwas $^n/_{10}$-Natronlauge gelöst und in einer Reihe untersucht. Durch Messung wurde seine optimale Koagulation zu $1{,}7 \cdot 10^{-5}$ festgestellt, einen Wert, den wir nur als einen vorläufigen betrachten, aber doch erheblich verschieden von dem des α-Nucleoproteids erkennen können.

Versuche zur Bestimmung des Koagulationsoptimums an verschiedenen Organextrakten.

Nunmehr haben wir den Versuch unternommen, noch auf anderem Wege die Beziehung unserer Flockung zu dem Trypsin zu beweisen. Wir haben nämlich einige andere Organextrakte in ganz entsprechender Weise untersucht, um zu sehen, ob sie sich ähnlich verhalten würden. Zu diesem Zwecke wurde aus den Organen, die wir untersuchen wollten, nach der Methode von Wiechowski[1]) Organpulver hergestellt, d. h. die Organe wurden zerhackt, durch 2 Siebe getrieben und dann auf Glasplatten dünn aufgetragen. Die Trocknung wurde bei niederer Temperatur mittels eines elektrisch betriebenen Ventilators hergestellt und die getrocknete Substanz schließlich im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Zur Gewinnung des Extraktes wurde eine abgewogene Menge des Organpulvers mit Wasser $^1/_2$ Stunde im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur extrahiert und die Aufschwemmung nachher filtriert. Es resultierte in der Regel eine klare, höchstens leicht trübe Flüssigkeit, die für unsere Untersuchungen sehr geeignet war.

1. Pankreas.

Um uns davon zu überzeugen, daß wir die an dem käuflichen Pankreatinpräparat gemachten Erfahrungen auf jedes

[1]) Wiechowski, Beiträge z. chem. Phys. u. Pathol. 9, 233, 1907.

Pankreasextrakt übertragen durften, machten wir zur Kontrolle entsprechende Versuche mit dem Pankreas von Mensch, Rind und Pferd. Wir kamen zu dem Resultat, daß sich aus allen untersuchten Pankreasextrakten mit Leichtigkeit unter Anwendung des oben beschriebenen Regulatorgemischs eine Flockung erzeugen läßt, deren Optimum mit dem beim Pankreatin Rhenania gefundenen Wert übereinstimmt. Betreffs der tryptischen Wirksamkeit dieser Flockungen ist das Nötige bereits gesagt: das aus frischem Pankreas ausgefällte Proteid wirkt nicht tryptisch. Hier müssen wir noch auf eine Beobachtung von Umber[1]) hinweisen. Diesem ist es nämlich durch Essigsäurefällung schon gelungen, das α-Nucleoproteid aus frischem Pankreasextrakt in guter Ausbeute und frei von proteolytischer Wirksamkeit zu erhalten. Er meint nun, daß sein Proteid reiner sei als das von Hammarsten, weil ihm ja kein Trypsin anhafte. Er stellt sich demnach auch auf den Standpunkt, daß das Trypsin vom Proteid gänzlich verschieden sei. Dagegen ist aber folgendes einzuwenden. Das frische Pankreas, das kein Trypsin enthält, muß doch jedenfalls sein Proferment enthalten, denn durch Autolyse entsteht ja das Trypsin spontan. Aus den Umberschen Versuchen ergibt sich aber nicht, ob dieses Proferment in seiner Fällung oder im Filtrat enthalten ist. Wenn sein Proteid aber das Proferment enthält, was er ja nicht ausschließen kann, so ist sein α-Proteid ebensowenig fermentfrei wie das von Hammarsten.

2. Milz.

Wir machten dann ähnliche Versuche mit der Milz, diesem exquisit kernreichen Organ, und stellten uns Milzextrakte aus frischer Rindermilz her. In dem von uns untersuchten Bereich der H-Ionenkonzentrationen, nämlich zwischen $3 \cdot 10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-6}$ beobachteten wir eine allerdings nur spärliche Trübung und Flockung, deren Optimum zu ungefähr $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ berechnet werden konnte. Da dieser Punkt ziemlich genau mit dem von Michaelis und Takahashi[2]) gefundenen Koagulationsoptimum der Blutkörperchenstromata übereinstimmt, glauben wir nicht fehlzugehen, wenn wir die in den Milz-

[1]) Umber, Zeitschr. f. klin. Med. 1900.

[2]) Michaelis und Takahashi, diese Zeitschr. 29, 349, 1919.

extrakten zu erzielende Flockung auf die Beimengung von Blutkörperchen beziehen.

3. Niere.

Daß Organextrakte in der Tat beim Fehlen eines besonderen Körpers, der bei unserer Versuchsanordnung eine starke Flockung hervorrufen könnte, durch Blutbeimengung eine geringe Flockung beim Koagulationsoptimum der Blutkörperchenstromata zeigen können, machen unsere Versuche mit Nierenextrakten noch wahrscheinlicher.

In einem aus Kalbsniere hergestellten Extrakt fanden wir eine mäßige Flockung, deren Optimum eine H-Ionenkonzentration hatte, die zu $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ berechnet und zu $2{,}2 \cdot 10^{-5}$ gemessen wurde. Als wir dann später Gelegenheit hatten, einen Nierenextrakt zu untersuchen, der von einem entbluteten Kaninchen stammte, fanden wir bei derselben H-Ionenkonzentration nur eine ganz leichte Trübung und erst nach 24 Stunden eine geringe Flockung, während sonst schon im Laufe von Minuten sich eine deutliche Flockung zu entwickeln pflegte.

4. Leber.

Bei Versuchen mit Extrakten aus Kalbsleber fanden wir eine mäßige Flockung, deren Optimum in einem Versuch der Berechnung nach bei $3{,}6 \cdot 10^{-5}$ lag, der Messung nach bei $4{,}1 \cdot 10^{-5}$. In einem Kontrollversuch waren die Werte $3{,}4 \cdot 10^{-5}$ und $3{,}5 \cdot 10^{-5}$.

Menschenleberextrakt dagegen zeigte in dem Aciditätsbereich von $1 \cdot 10^{-3}$ bis $8 \cdot 10^{-6}$ in einem Versuch keine Trübung oder Flockung. Das klare Extrakt gab aber bei der Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe eine starke Fällung und zeigte bei der Hitze Koagulation. Hingegen zeigte gewöhnlicher wässeriger syphilitischer Leberextrakt, der in zehnfacher Verdünnung gebraucht wurde, in zwei Versuchen eine deutliche Flockung, die zu $7 \cdot 10^{-5}$ berechnet werden konnte.

Wenn wir auch der Meinung sind, daß die Differenz zwischen dem Koagulationsoptimum des Leberextraktes einerseits und dem des Milz- und Nierenextrakts andererseits zu groß ist, um in das Bereich der Fehlerquellen zu fallen, so können wir doch noch keinen weiteren Aufschluß über die Be-

deutung der zuerst genannten Flockung geben, behalten uns aber vor, diese Frage noch zu bearbeiten.

5. Muskel.

In einem Extrakt, das aus entbluteten Kaninchenmuskeln hergestellt war, bekamen wir mit unserer Versuchsanordnung weder Trübung noch Flockung.

6. Leukocyten.

Schließlich hatten wir noch Gelegenheit, den ganz entsprechend den übrigen Organen verarbeiteten Eiter einer an Brustfellempyem erkrankten Patientin untersuchen zu können. Wir fanden in diesem Extrakt gleichfalls ein deutliches Koagulationsoptimum mit einer gemessenen Acidität von $2{,}3 \cdot 10^{-5}$ gegenüber $2{,}7 \cdot 10^{-5}$ nach der Berechnung.

Zusammenfassung.

Die isoelektrische Konstante des Trypsins wird durch Überführung = etwas größer als $1{,}35 \cdot 10^{-4}$ gefunden.

Bei der damit praktisch übereinstimmenden Wasserstoffionen-Konzentration von $2{,}6 \cdot 10^{-4}$ liegt das Koagulationsoptimum eines aus Pankreasextrakten fällbaren „α-Nucleoproteids", das beinahe das gesamte Trypsin der Lösung in sich schließt, aber auch aus solchen Pankreasextrakten gewonnen werden kann, die keine tryptische Wirkung haben. In diesem Fall wirkt das Proteid nicht tryptisch. Das Trypsin stellt daher wahrscheinlich eine sehr leichte chemische Modifikation des Nucleoproteids dar. Unter dieser Voraussetzung ist die Ausfällung des Nucleoproteids im isoelektrischen Punkt gleichsam eine Reindarstellung des Trypsins.

Das Flockungsoptimum des β-Nucleoproteids ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$) und des bei seiner Darstellung abgespaltenen Eiweißkörpers (ca. $1{,}7 \cdot 10^{-5}$) ist von dem des α-Nucleoproteids deutlich verschieden.

Aus keinem anderen Organ läßt sich bei $[H^{\cdot}] = 2{,}6 \cdot 10^{-4}$ oder in weiter Umgebung davon irgend ein Fällungsoptimum nachweisen; es handelt sich somit um einen für das Pankreas durchaus charakteristischen Befund.

Über die Erkennung von enzymatischer Nucleinsäurespaltung durch Polarisation.

Von

C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

Vor einiger Zeit habe ich darauf hingewiesen, daß vergorene Zuckerlösungen nicht, wie fast allgemein angenommen wird, optisch inaktiv sind, sondern ein wechselndes Drehungsvermögen besitzen, das bald nach rechts, bald nach links gerichtet ist. Wie damals bereits erwähnt wurde, haben sich mancherlei Anhaltspunkte dafür ergeben, daß die Nucleinsäure der Hefe bzw. ihre Spaltungsprodukte am Eintritt dieser Erscheinung beteiligt sind. Versuche, die ich mit Herrn cand. phil. Noack[1]) weiter in dieser Richtung angestellt habe, zeigten, daß die lebende Hefe befähigt ist, zugesetzte Nucleinsäuren abzubauen, wie es für die durch Chloroform abgetötete Hefe und die in ihr enthaltenen Nucleinsubstanzen zuerst von Salkowski[2]) festgestellt worden ist. Um ein der Hefe adäquates Material zu benutzen, haben wir die Hefenucleinsäure selbst verwendet, die uns von der Firma C. F. Boehringer & Söhne, Waldhof, sowie von M. Leprince in Paris freundlichst zur Verfügung gestellt worden ist. Die Untersuchungen über die Natur der bei dieser Nucleinsäurespaltung entstehenden Produkte ist noch nicht abgeschlossen; ihre polarimetrische Untersuchung lehrt, daß es sich z. T. um optisch-aktive Substanzen handelt. Bei den vielfach ausgeführten Drehungsbestimmungen haben wir nie beobachtet, daß die Lösung ihre optische Aktivität einbüßt, wie jüngst G. Pighini[3]) mitteilt, der gleichfalls den Abbau der Hefenucleinsäure, allerdings durch andere Enzyme, studiert hat.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 430, 1910.

[2]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 527, 1889.

[3]) G. Pighini, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 85, 1910.

Die Angaben Pighinis über die Brauchbarkeit der Hefenucleinsäure für den polarimetrischen Nachweis von Nucleasen kann ich durchaus bestätigen.

Löst man 2,0 g Nucleinsäure (Boehringer) in 80,0 ccm H_2O unter Zusatz von so viel KOH oder NH_3, daß gerade deutlich alkalische Reaktion auf Lackmus besteht, und füllt auf 100,0 ccm auf, so ist die Rechtsdrehung im 2-Dezimeterrohr genau gleich einer 3,0%igen Traubenzuckerlösung. 2,0 g Nucleinsäure (Leprince) zeigten unter denselben Bedingungen eine Rechtsdrehung = 3,05% Glucose. Besonders bequem ist die Anwendung des Boehringerschen nucleinsauren Natriums, das sich völlig klar in Wasser löst. Die 2%ige Lösung dreht wie eine 2,9%ige Traubenzuckerlösung. Die starken polarimetrischen Ausschläge machen die Benutzung sehr bequem.

Bemerkung zur Publikation des Herrn V. Njegovan.[1])

Von

Sigmund Fränkel.

(Eingegangen am 16. Dezember 1910.)

Herr V. Njegovan macht in seiner vorläufigen Mitteilung den Versuch, ein von mir und Aladar Elfer[2]) angegebenes Verfahren, Serum, Gewebe usw. durch Binden des Wassers an wasserfreies Natriumsulfat zu trocknen, sich für die Milch zu sichern. Es ist jedenfalls sehr originell, sich ein fremdes Verfahren, das die Verfasser durch die Veröffentlichung freigegeben, vorbehalten zu wollen, aber es muß unsererseits um so mehr dagegen Einspruch erhoben werden, als die weitere Verarbeitung des Trockengutes mit Alkohol zwecks Extraktion der Phosphatide durchaus nicht zu empfehlen ist.

[1]) Diese Zeitschr. 29, 491, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 28, 330, 1910.

Berichtigung.

In der Arbeit von **Y. Tahara** (diese Zeitschr. 30, 255, 1910) muß es heißen:

S. 256, Zeile 13 von unten Messer statt Wasser.

S. 262, Tabelle, letzte Kolumne mg statt g.

S. 268, Zeile 18 von unten $C_{16}H_{31}NO_{16}$ statt $C_{16}H_{13}NO_{16}$.

Autorenverzeichnis.

Aron, Hans. Wachstum und Ernährung. S. 207.

Battelli, F. und L. Stern. Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. S. 172.

Baudrexel, August siehe Völtz und Baudrexel.

Berg, Ragnar. Über die Ausscheidung von per os eingeführten Phosphaten, besonders der Calciumphosphate. S. 107.

Davidsohn, Heinrich siehe Michaelis und Davidsohn.

Fränkel, S. Bemerkung z. Publikation d. Herrn V. Njegovan. S. 506.

Fürth, Otto von und Karl Schwarz. Über die Verteilung des Extraktivstickstoffes im Säugetiermuskel. S. 413.

Galeotti, G. Versuche einer Isolierung des uricolytischen Fermentes. S. 374.

Ginzberg, Alexander. Die chemischen Vorgänge bei der Kumys- und Kefirgärung. I. S. 1.

— — Desgl. II. S. 25.

Greifenhagen, W. Oxydation mehrwertiger Alkohole und ihrer Aldehyde bzw. Ketone durch Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung. S. 151.

Hasselbalch, K. A. Elektrometrische Reaktionsbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten. S. 317.

Hausmann, Walther. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. S. 276.

Kepinow, L. Über den Einfluß der Blutkörperchenlipoide auf die Blutbildung. S. 160.

Küstenmacher, M. Zur Chemie der Honigbildung. S. 237.

Lapidus, Herman. Diastase und Handelslecithin. S. 39.

Michaelis, Leonor und Heinrich Davidsohn. Trypsin und Pankreasnucleoproteid. S. 481.

— — Zur Theorie des isoelektrischen Punktes. S. 143.

Neuberg, C. Über die Erkennung von enzymatischer Nucleinsäurespaltung durch Polarisation. S. 505.

Reichel, Johannes. Über das Verhalten von Penicillium gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen. S. 152.

Rona, P. Über das Verhalten des Chlors im Serum. S. 332.

— — und Dengo Takahashi. Untersuchungen über den Blutzucker. VIII. S. 99.

Scaffidi, Vittorio. Untersuchungen über den Purinstoffwechsel. V. S. 473.

Schwarz, Karl siehe v. Fürth und Schwarz.

Spindler, Franz. Beiträge zur Kenntnis der Milchkatalase. S. 384.

Starkenstein, Emil. Die biologische Bedeutung der Inositphosphorsäure. S. 56.

Stern, L. siehe Battelli und Stern.

Stoklasa, Julius und Wenzel Zdobnický. Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus

Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll. S. 433.
Tahara, Y. Über das Tetrodongift. S. 255.
— — Berichtigung. S. 506.
Takahashi, Dengo siehe Rona und Takahashi.
Vandevelde, A. J. J. siehe De Waele und Vandevelde.
Völtz, Wilhelm und August Baudrexel. Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. S. 457.
Voorhoeve, N. Beiträge zum Kalkstoffwechsel. I. S. 195.
Waele, H. De und A. J. J. Vandevelde. Über das Schicksal von injizierten artfremden Eiweißkörpern und Peptonen. S. 227.
Weisz, Moriz. Über die Vorstufen des normalen gelben Harnfarbstoffs in ihren Beziehungen zur Diazoreaktion und über eine colorimetrische Schätzung des Urochroms sowie des Urochromogens. S. 333.
Wender, Neumann. Über den Einfluß inaktiver Substanzen auf die Rotation der Lävulose. S. 357.
Zdobnický, Wenzel siehe Stoklasa und Zdobnický.

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Breslau, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Brodig-Zürich, A. Durig-Wien, P. Ehrlich-Breslau, C. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Reichmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, M. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Einunddreißigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1911.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Nachruf auf Christian Bohr . . . . . I—III

Gröber, A., Über Veronal 1

Handovsky, Hans und **Richard Wagner.** Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithin-eiweißmischungen 32

Bauer, J. und **St. Engel.** Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch. 46

Braun, H. Beiträge zur Kenntnis des Komplementes 65

Fürth, Otto von und **Carl Schwarz.** Über die Hemmung der Suprareninglucosurie und der sekretorischen Nierenleistung durch peritoneale Reize 113

Kawashima, K. Zur Kenntnis der Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren 135

Löwenstein, Ernst und **Ernst P. Pick.** Studien über Antigenbildung in eiweißfreien Nährmedien. I. 142

Lyttkens, H. und **J. Sandgren.** Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Menschenblut 153

Loew, Oscar. Zur Theorie der Enzymwirkung 159

Loeb, Jacques und **Hardolph Wasteneys.** Weitere Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Oxydationsgröße und Cytolyse der Seeigeleier 168

Magnus-Levy, A. Über die Resorption von Cholesterinestern . . . 169

Neuberg, C., und **A. Hildesheimer.** Über zuckerfreie Hefegärungen. I. 170

Ohta, Kohshi. Über die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze nebst dem Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis 177

Zaleski, W. Zum Studium der Atmungsenzyme der Pflanzen 195

Rona, P. und **A. Döblin.** Untersuchungen über den Blutzucker. IX. 215

Yoshimura, Kiyohisa. Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime 221

Slowtzoff, B. Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern . . 227

Slowtzoff, B. J. und **L. W. Sobolew.** Über die chemischen Veränderungen in der Leber bei einigen pathologischen Prozessen 234

Bang, Ivar und **E. Overton.** Studien über die Wirkungen des Kobragiftes 243

Reinhardt, Richard und **Ernst Seibold.** Das Verhalten der Schardingerschen Reaktion gegenüber Colostralmilch von Kühen . . . 294

Seite

Shibata, Nagamichi. Das Verhalten des Fettes tierischer Organe bei antiseptischer Aufbewahrung 321

Rona, P. und **D. Takahashi.** Über das Verhalten des Calciums im Serum und über den Gehalt der Blutkörperchen an Calcium 336

Rona, Peter und **Leonor Michaelis.** Über Ester- und Fettspaltung im Blute und im Serum 345

Völtz, Wilhelm und **August Baudrexel.** Nachtrag zu der Arbeit: Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus 355

Löb, Walther. Bemerkungen zu der Arbeit von Stoklasa und Zdobnický: Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll 358

Kochmann, Martin. Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde, nebst Bemerkungen über den Stoffumsatz der Phosphorsäure und der Magnesia. I. 361

Juschtschenko, A. J. Über den Nucleasegehalt verschiedener Organe des Menschen und der Tiere 377

Reinhardt, Richard und **Ernst Seibold.** Das Schardinger-Enzym in Milch von euterkranken Kühen 385

Sörensen, S. P. L. und **E. Jürgensen.** Über die Hitzekoagulation der Proteine. I. 397

Bach, A. Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. I. 443

Loeb, Jacques (unter Mitwirkung von **Hardolph Wasteneys**). Die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze 450

Battelli, F. und **L. Stern.** Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe 478

Tswett, M. Über die Dualität der Chlorophyllane 505

Autorenverzeichnis 507

Über Veronal.

Von

A. Gröber.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1910.)

Mit 4 Figuren im Text.

Fast könnte es überflüssig erscheinen, heute noch über Veronal zu schreiben. Sind doch jetzt bereits 7 Jahre vergangen, seit E. Fischer und J. v. Mering[1]) das Veronal als Schlafmittel empfohlen und in die Praxis eingeführt haben.

Um so überraschender ist die Tatsache, daß eine genauere Untersuchung des Veronals auf seine pharmakodynamischen und toxischen Wirkungen hin bis jetzt nicht ausgeführt ist. Wenigstens ist es mir nicht gelungen, in der mir zugängigen Literatur auch nur eine Arbeit über Veronal zu finden, mit experimentell gewonnenen Resultaten, die einigen Anspruch auf Genauigkeit machen könnten.

Ja, es ist bisher nicht einmal die geringste, absolut tödliche Dosis pro Kilogramm Tier — besonders Warmblüter — für das Veronal festgestellt worden!

O. Schmiedeberg gibt in der neuesten (6.) Auflage seines Grundrisses der Pharmakologie noch 1,0 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht

---

[1]) Über eine neue Gruppe von Schlafmitteln. Therapie der Gegenwart, 1903, 97 ff.

als tödliche Dosis an, eine Zahl, die er wohl der Arbeit von P. Kleist[1]) entnommen hat, die, wie ich sogleich nachweisen werde, nichts weniger als genau ist. Bevor ich näher auf sie eingehe, will ich kurz einige andere, kürzere Arbeiten erwähnen, deren ich hier gedenken muß.

Ich nenne zuerst die erste Arbeit über Veronal überhaupt, die schon oben zitierte von E. Fischer und J. v. Mering[2]).

Hier finden sich über Veronal nur zwei Versuche, an einem und demselben Hunde nacheinander ausgeführt, als Versuch Nr. 9. Die übrigen Versuche kommen hier nicht in Betracht; sie beziehen sich auf dem Veronal verwandte Körper (Proponal usw.), auf die Ausscheidung all dieser Körper aus dem Organismus usw., wie denn überhaupt die Tendenz dieser Arbeit ausschließlich die ist, aus einer Gruppe ähnlich konstituierter, ähnlich — nur quantitativ verschieden — wirkender Substanzen die herauszufinden, deren Wirkung den gestellten Anforderungen — möglichst große Schlafwirkung bei möglichst geringer Gift- bzw. Nebenwirkung — am nächsten kommt. Der Hund erhielt im ersten Versuche 0,133 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht, im zweiten 0,2 g. Völlige Erholung.

Aus anderen Gründen sei hier noch die Arbeit von C. Trautmann[3]) angeführt. Trautmann findet, daß in den ersten 3 Tagen nach allmählicher Einnahme von 4,0 g Veronal die N-Ausscheidung um 3 g vermindert wird = 90 g Muskelfleisch, „die eingespart werden". Trautmann empfiehlt daher die Darreichung von Veronal als Schlafmittel — falls ein solches indiziert ist —, „bei allen Erkrankungen, bei denen erfahrungsgemäß eine Steigerung des Eiweißzerfalles stattfindet" (auch bei febrilen Erkrankungen, Diabetes mellitus usw.).

Sonst nenne ich hier noch Berent[4]), auf den ich später zurückkomme, und H. Raschkow[5]) (den auch P. Kleist zitiert) mit Tierversuchen. Die übrigen Autoren bringen Beobachtungen am Krankenbette über die Schlafwirkung des Veronals am Menschen bei verschiedenen Krankheiten, oder sie beschreiben — oder begutachten — Fälle von Veronalvergiftungen an Menschen. Von letzteren Fällen sind die interessantesten wohl, als Vertreter der akuten Vergiftung der sog. Holzmindener Fall — Harnack[6]), Jacobj[7]), —, als Vertreter der chro-

---

[1]) Über die physiologische Wirkung des Veronals. Ibidem, 1904.

[2]) Siehe Fußnote 1 Seite 1.

[3]) Der Einfluß des Veronals auf die Stickstoffausscheidung beim Menschen. Ibidem, 1903, 438f.

[4]) Über Veronal. Therap. Monatshefte 17, 279, 1903.

[5]) Veronal, ein neues Schlafmittel. Wiener klin. Rundschau, 1903, 744f.

[6]) a) Münch. med. Wochenschr. 1905, H. 47; b) Vierteljahrsschrift für gerichtl. Medizin 1909, H. 3: „Nochmals der Holzmindener Fall".

[7]) Ibidem, H. 2: „Beitrag zur Beurteilung der Filix- u. Veronalvergiftung".

nischen Vergiftung oder des Veronalismus der von R. Laudenheimer[1]) beschriebene Fall.

Auf alle diese klinischen bzw. kriminellen Fälle kann ich hier zunächst nicht weiter eingehen. Über die akuten Veronalvergiftungen speziell wird am Schlusse dieser Arbeit noch einiges zu sagen sein.

Jetzt komme ich zur Besprechung der schon oben erwähnten Arbeit von P. Kleist. Kleist zieht aus seinen zu Beginn der Arbeit gebrachten Froschversuchen (aus welchen von diesen oder ob aus allen, wird nicht gesagt) den Schluß: „Die letale Dosis beträgt ebenso wie beim Warmblüter (Raschkow . . .) 1 g pro Kilogramm Frosch." Zur Berechnung der letalen Dosis Veronal pro Kilogramm Frosch sind von seinen Froschversuchen aber nur die Versuche Nr. 1, 2, 4, 5 brauchbar. Frosch Nr. 4 mit 0,5 g Veronal pro Kilogramm erholt sich, die anderen drei (von 1,4 g bis 4,25 g Veronal pro Kilogramm) sterben. Das gestattet, da eine Einengung (größte Dosis bei der absolut sicher Erholung, kleinste, bei der absolut sicher Tod eintritt) nicht stattgefunden hat, nur die Berechnung eines Mittelwertes aus den genannten 4 Versuchen, und der ist = 1,91 g Veronal pro Kilogramm Frosch, nicht 1,0 g. — Bei Frosch Nr. 3 fehlt die Gewichtsangabe, die Frösche Nr. 6 und 7 sind Reflexfrösche.

Diesen 7 Froschversuchen folgt Versuch Nr. 10, am Hunde, dessen Gewicht nicht angegeben ist, sich aber zweifellos in Versuch 8 oder 9 finden würde (denn es heißt am Anfang von Versuch 10: „Derselbe Hund"), wenn nicht leider diese beiden Versuche vollständig fehlten. Versuch 11 am gleichen Hunde enthält auch keine Gewichtsangabe. Es folgen dann 3 Versuche an Kaninchen (Nr. 12 mit 0,06 g Veronal, Nr. 13 am gleichen Tier wie 12 mit 0,12 g Veronal, Nr. 14 mit 0,27 g Veronal pro Kilogramm Tier). Alle 3 Kaninchen erholen sich.

Endlich folgt eine Serie von Versuchen an zwei kleinen Hunden (Alter: 8 Wochen). Hund a wog 2,44 kg, Hund b 2,83 kg. Die Normaltemperaturen schwanken zwischen 37,9° und 38,3° C, rectal gemessen. Beginn der Versuchsreihe am 18. IV. 04. Beide Tiere erhalten allabendlich Veronal, und zwar Hund a ca. 0,20 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht, Hund b ca. 0,18 g pro Kilogramm. Am 20. IV. schon erscheint b krank. Die Injektionsstellen sind druckempfindlich. Hund a stirbt, von einem größeren Hund getreten, an Leberruptur am 22. IV. 04, also am 5. Tage des Versuchs. Hund b zeigt am 25. IV. an zwei Injektionsstellen Abscesse, die inzidiert, tamponiert und verbunden werden. Am 29. IV. erhält Hund b das $1^1/_2$fache der bisherigen Dosis 10^{20} morgens. 5^h nachmittags moribund, Atmung 1 bis 3 pro Minute, Temperatur anal 24,9° C, in der frisch eröffneten Bauchhöhle 34,9° C (!).

Am 19. IV. ist übrigens bei der Injektion scheinbar eine Vene verletzt worden, bzw. die Injektion zufällig intravenös geschehen: „10^{45} 0,5 g Veronal in H_2O gelöst, an zwei Stellen des Rückens injiziert. Aus einer

[1]) Therapie der Gegenwart 1904, Januarheft.

Injektionsstelle quellen ein paar Tropfen Blut." Nach 2 Minuten mühsamen Sichfortschleppens bricht das Tier plötzlich zusammen. Kleist selbst nimmt eine Gefäßverletzung an.

Kleist sagt im Resumée, das per os ungelöst applizierte Veronal werde durch das Alkali des Darmes bald gelöst. Zirka $^1/_2$ Stunde nach Eingabe des Veronals beginne seine Resorption, die schneller eintrete bei Applikation einer Lösung von Veronal, per os oder subcutan. Bei Anlegung eines subcutanen Depots von ungelöstem Veronal ist die Resorption gering. So war ein Depot von 4,0 g Veronal erst nach einigen Tagen völlig resorbiert.

Zittern während des Schlafes, „als ob die Tiere frieren". Infolge der Herabsetzung des Stoffwechsels (Kleist zitiert hier die N-Ausscheidungsversuche von Trautmann[1]) Absinken der Temperatur. Es heißt wörtlich: „In der Tat konnte bei verschiedenen Versuchen eine Temperaturerniedrigung festgestellt werden, die bei größeren Dosen Veronal bis zu 3° C beträgt (Versuch Nr. 15, Hund b, 18. IV. 04)[2]). Es ist möglich, daß der unruhige Schlaf nach großen Dosen, und das nach dem Erwachen auftretende Unlustgefühl, das sich durch Stöhnen und Umherwerfen zu erkennen gab, zum Teil durch diese Temperaturerniedrigung bedingt ist." Kleist schließt aus dem Verlaufe der Temperaturerniedrigung, daß die Veronalwirkung 3 Stunden nach Eingabe am stärksten sei. „Intravenöse Injektionen wirken sofort und führen in großen Dosen augenblicklich schwere komatöse Zustände herbei." Das Zittern während des Veronalschlafes faßt Kleist auf als künstlichen Schüttelfrost infolge Kontraktion der Hautgefäße und hierdurch hervorgerufenes Frostgefühl.

Aus dem hier Referierten, aus der Tatsache, daß Versuch 8 und 9 — offenbar vom Verfasser unbemerkt[3]) — in der Publikation völlig fortgeblieben sind, aus dem Umstand, daß Verfasser bei seinen Froschversuchen scheinbar überhaupt keine Berechnung pro Kilogramm Tiergewicht ausgeführt hat, aus dem Widerspruch zwischen der bei Analmessung (24,9° C) und der bei Messung in der eröffneten Bauchhöhle gefundenen Temperatur (34,9° C) — eine Differenz von 10° C! — scheint mir hervorzugehen, daß diese einzige ausführlichere Experimentalarbeit über Veronal, die ich daher auch ausführlicher besprechen mußte, zu wenig exakt ist, als daß man eine sichere Beurteilung der Wirkungsweise des Veronals auf sie gründen könnte.

Ich komme jetzt zu der schon oben zitierten Arbeit von H. Raschkow. Er bringt 6 Versuche an Hunden, und zwar gibt er folgende Dosen von Veronal pro Kilogramm Tier: Im Versuch 1: 0,104 g,

---

[1]) S. o.

[2]) Von 38,0° C auf 35,0° C an diesem Tage. Später infolge der Abscesse kein reines Bild (offenbar Fieber!).

[3]) Das geht hervor aus den Anfangsworten von Versuch 10: „Derselbe Hund".

2: 0,143 g, 3: 0,21 g, 4: 0,29 g (0,2857 g genauer). Die Tiere dieser 4 Versuche blieben am Leben. Er gab ferner pro Kilogramm Hund im Versuch 5: 1,25 g, 6: 0,86 g Veronal. Diese beiden Tiere starben. Verfasser sagt dazu: „Pro Kilogramm Tier kommt also im Durchschnitt 1 g Veronal auf die letale Dosis." — Dazu ist noch zu bemerken, daß in Versuch 1 bis 4 das Veronal in Milch gereicht wurde. Es wird nicht gesagt, ob gelöst oder aufgeschwemmt. Da Verfasser sagt, die Tiere nehmen es, so kam wohl der Magenschlauch nicht zur Anwendung. Es könnte also immerhin etwas zurückgeblieben sein. In Versuch 5 und 6 wurde das Veronal auf Zucker und Semmel bzw. auf Zucker, also ganz sicher ungelöst gegeben. Daraus erklärt sich wohl auch der späte Eintritt des Exitus letalis (in Fall 5 erst nach $> 8\,^1/_4$ Stunden, in Fall 6 nach $7\,^1/_4$ Stunden) bei so großen Gaben. Auch diese Arbeit, auf die sich Kleist bezieht, ist zur Feststellung der letalen Dosis unbrauchbar Denn Verfasser macht in der Dosierung des Veronals einen Sprung von 0,29 g pro Kilogramm auf 0,86 g bzw. 1,25 g pro Kilogramm und erklärt nun, es komme durchschnittlich 1,0 g auf die letale Dosis, ohne Rücksicht auf Gaben, die zwischen 0,29 und 0,86 g liegen und tödlich wirken könnten!

Berent (s. o.) hat bei seinen 3 Tierversuchen keinen Exitus letalis erzielt. Er gab dem gleichen Hunde 1. 0,147 g, nach 3 Tagen 0,245 g, nach weiteren 3 Tagen 0,4 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht. Im letzten dieser 3 Versuche erbrach das Tier reichlich in der Zeit vom Ende der 1. bis zum Ende der 5. Stunde post applicationem. Es hat demnach reichlich Speise im Magen gehabt. Dieser Umstand allein bedingte schon eine Abschwächung der Veronalwirkung infolge verlangsamter Resorption. Dazu kommt eine weitere Beeinträchtigung der Wirkung dadurch, daß mit den Speiseresten ganz zweifellos ein Teil des eingeführten Veronals durch das Erbrechen eliminiert wurde.

Die in den nachstehenden Tabellen publizierten Versuche habe ich auf Anregung von Herrn Geheimrat Jacobj s. Z. angestellt, unter möglichster Beachtung aller ev. wichtigen Punkte (Atmung, Puls, Temperatur, Reflexe usw.). Wo Versuchsfehler untergelaufen sein könnten, werde ich besonders darauf hinweisen. Die Froschversuche sind mehr als Kontrolle für die am Fleischfresser beobachteten krampfhaften Erscheinungen anzusehen. Auf Feststellung der geringsten eben noch sicher tödlichen Dosis kam es mir beim Warmblüter, nicht beim Frosche an. — Ich hoffe im folgenden ein den Tatsachen entsprechendes Bild von der Wirkung des Veronals geben zu können.

Bevor ich auf meine Versuchsresultate näher eingehe, möchte ich kurz noch einige Erläuterungen geben.

Was unter „Ohrmuschel-Reflex" zu verstehen ist, geht aus Versuch 4, Spalte 4, 11^{45} deutlich hervor. Im selben Versuche ist später von einem Lid- und Schnurrhaar-Reflex die Rede. Letzterer läßt sich von denselben Punkten auslösen, wie der Lidreflex, scheint aber, wenigstens bei der Katze, noch empfindlicher zu sein. Die Auslösung geschieht mit einem feinen Stäbchen, einer stumpfen Bleistiftspitze oder dgl. von einem Punkte aus, der ca. $^1/_2$ cm hinter und ca. $^1/_2$ bis $^3/_4$ cm über dem äußeren Lidwinkel der Katze liegt. Man trifft dort einen Punkt des oberen Randes der Orbita. Es erfolgt Schlußbewegung des oberen Lids und Aufstellen der größten Schnurrhaare. Dieser Reflex läßt sich nicht selten auch längs des ganzen unteren und ev. auch eines Teils des oberen Orbitalrandes auslösen, wenn auch meist schwächer.

Ferner möchte ich ausdrücklich betonen, daß ich den bei der Atemfrequenz- und Atemvolumprüfung vor dem Versuche gewonnenen Werten weder beim Kaninchen noch bei der Katze einen sehr großen Anspruch auf Richtigkeit zuerkennen möchte, da die Tiere gewöhnlich infolge der nötigen Manipulationen etwas erregt waren. Anspruch auf Exaktheit haben nur die im Verlaufe der Narkose erhaltenen Werte. Aus dem gleichen Grunde wurde auf Pulsbestimmung vor dem Versuche verzichtet, besonders, da wir ohnehin wissen, daß die Pulsfrequenz des normalen Kaninchens z. B. ca. 220 bis 240 pro Minute beträgt.

Versuch 24 ist in die Tabellen nicht aufgenommen, da das Tier infolge eines Versehens bei der Dosierung eine recht reichliche, doch in ihrer Größe unbekannte Gabe Veronal erhielt. Es handelte sich um eine Katze von 2,57 kg Gewicht, Atmung 50 pro Minute = 1125 ccm, Rectaltemperatur 39,2° C. Das Tier erhielt am 24. II. 08, 8^{30} zunächst 0,35 g Veronal pro Kilogramm = 0,8995 g Veronal in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C gelöst per Magenschlauch. Später (10 Minuten nach der ersten Gabe) bekam das Tier aber noch einmal eine große, wenn auch der ersten nicht gleiche Dosis, während deren Applikation es sich losmachte und entsprang, so daß die Menge des wirklich gegebenen Veronals sich nicht feststellen ließ. Das war 8^{40}. 9^{00} tiefer Schlaf, ohne jede Exzitation. Am 25. II. 08, morgens 8^{00} tot vorgefunden, schon erkaltet. Sektion: Trachea, Larynx, Lungen völlig normal! Im Duodenum langgedehnte streifenförmige, sehr deutliche Hyperämie. Dieser Versuch ist aus später zu erörternden Gründen wichtig.

Gleichfalls nicht in die Tabellen aufgenommen ist Versuch Nr. 16. Es ist ein Blutdruck-Versuch an einer mit Veronal vergifteten Katze. Die Beschreibung folgt weiter unten.

Die Temperaturmessungen verstehen sich stets rektal in Grad C bei möglichst gleichmäßig tiefer (durch Verwendung von Kniethermometern gewährleisteter) Einführung des Quecksilbergefäßes, das ca. 8 cm über den Sphincter ani hinaufgeführt wurde. So erhält man sehr sichere, gleichmäßige und vergleichbare Resultate. Hier ist der Ort, auf den Widerspruch in den beiden Messungen von Kleist hinzuweisen: Seine Analmessung ist vermutlich im Sphincterring, oder nur eben darüber, und nicht lange genug, ausgeführt worden. Sonst ist eine derartige Verschiedenheit zwischen Anal- und direkter Bauchhöhlenmessung ganz unerklärlich! Kleist selbst scheint das übrigens nicht besonders aufgefallen zu sein, denn er äußert sich in keiner Weise dazu.

Nach diesen Vorbemerkungen komme ich nun zur Besprechung meiner Versuchsresultate. Und zwar will ich mit dem einfachsten von allem, mit der letalen Dosis beginnen.

Die geringste noch sicher tödliche Gabe Veronal liegt nach meinen Versuchen und Kontrollversuchen für Kaninchen und Katze zwischen 0,25 g und 0,3 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht, für den Hund zwischen 0,45 g und 0,5 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht, also für Kaninchen und Katze um $66^2/_3$ bis $75\,\%$, für den Hund um 50 bis $55\,\%$ tiefer als bisher — für alle Tiere ohne Unterschied — angegeben. Frösche (Ran. escul.) erholen sich nach 0,5 g Veronal pro Kilogramm völlig.

Auffällig ist in allen Versuchen, in denen die Atmung geprüft werden konnte, deren Verhalten. Selbst wenn man von den — wie schon gesagt, vielleicht zu hohen — Normalwerten (in Spalte 1) absieht, fällt doch die Herabminderung nicht nur der Frequenz, sondern auch des Volumens der einzelnen Atemzüge auf (bis auf 8,5 ccm auf einen Atemzug, Katze, Versuch 4).

Die Eigenwärme sinkt bei entsprechenden Gaben (0,35 g pro Kilogramm) enorm, bis auf 24,6° C rectal (Versuch 4). In diesem Versuche steigt trotz des schließlich tödlichen Ausganges die Temperatur nicht unbeträchtlich wieder an, um

ante mortem wieder abzusinken. Bei Versuch 23 (Katze) findet ein Absinken der Körpertemperatur auf 29,4° C (rectal) statt, ohne daß das Tier stirbt! Die Frequenz der Atmung geht in Versuch 4 auf 4 pro Minute, in Versuch 28 von 28 (Hund) auf 4 bis 6 pro Minute herab. Wie man sieht, handelt es sich bei diesen großen Ausschlägen um Fleischfresser, Katze oder Hund. Bei diesen Tieren sinkt auch die Pulsfrequenz am stärksten. Überhaupt waren an den Fleischfressern sämtliche Symptome weit stärker ausgeprägt, als beim Kaninchen. Nie fand ich beim Kaninchen ähnliche geringe Werte für Puls (bei der Katze in Versuch 4 84 pro Minute) oder Atmung wie bei den Fleischfressern, noch auch Biotsches Atmen, das in Versuch 27 ganz ausgeprägt, bei den übrigen Versuchen an Katze und Hund, wenn auch nicht so deutlich wie eben in Versuch 27 (Hund), so doch immerhin — wenigstens zeitweise — angedeutet war (so bei den Versuchen Nr. 4, 28, 29), wie ich hier zur Ergänzung der Tabellen noch bemerken will.

Auf das Verhalten der Reflexe gehe ich hier nicht noch einmal näher ein, da darüber alles Nötige, teils in den Tabellen, teils in dem sie einleitenden Teile des Textes schon gesagt ist, worauf ich hier verweise.

Aber zweierlei muß ich hier noch einmal besonders erwähnen, zwei Tatsachen, die für die Veronalvergiftung geradezu pathognomonisch zu sein schienen, 1. die bei den Fleischfressern vor Eintritt des Komas und während seines ersten Stadiums eintretenden, später erlöschenden, vor der Erholung sich aber wieder einstellenden, z. T. ganz furchtbaren krampfhaften Erscheinungen, teils tetanischer, teils klonischer Natur, 2. einen charakteristischen Obduktionsbefund im Gebiete des Respirationsapparates.

Zunächst möchte ich über die Krämpfe einige Worte sagen. Beim Kaninchen sah ich sie nie ausgeprägt. Dagegen oft, ja fast stets — wenigstens andeutungsweise — bei Katze und Hund. Wo sie bei Katze und Hund fehlen, tritt wenigstens eine erheblich gesteigerte Reflexerregbarkeit an ihre Stelle. Ganz besonders deutlich waren sie in den Versuchen Nr. 4, 5, 6, 23, 25, 26, 27 zu sehen, z. T. gesteigert bis zum Tetanus, der in Versuch 27 ununterbrochen durch mehr als 18 Minuten anhält, wobei das Tier ständig in größter Gefahr

war zu ersticken. In den übrigen Versuchen am Fleischfresser waren die Erscheinungen nicht so stürmisch, doch bestand deutlich eine Übererregbarkeit, von maximal gesteigerter Reflexerregbarkeit bis zu klonischen Zuckungen. Andeutungen dieser gesteigerten Erregbarkeit finden sich übrigens auch bei einigen Kaninchen und bei den Versuchen Nr. 14, 15, 19, 20, 30, (Frösche).

Bei sehr großen Gaben, wie in Versuch 24 (s. o.) können diese Exzitationsstadien gänzlich fehlen. Offenbar tritt hier die Narkose infolge der hohen Dosis zu schnell ein. Auch Versuch 29 scheint hierher zu gehören.

Die Frösche in Versuch 20 und 30 — Winterfrösche — sind zwecks Beschleunigung der Resorption der Veronallösung 60 Stunden in trockener Zimmerluft bei ca. 20 bis 25° C gehalten worden, ohne Fütterung, ohne viel Wasser (nur so viel als eben zur Hautatmung nötig war).

Über die nähere Ursache der bei den Fleischfressern beobachteten Krämpfe möchte ich mich nicht äußern. Dazu bedürfte es noch eingehenderer Untersuchungen. Doch ist hier der Platz, auf die Arbeit von Sigmund Fränkel[1]) zu verweisen. Ob seine Deutung richtig ist, lasse ich dahingestellt. Beim Kaninchen findet sich als Analogon zu den Krämpfen der Fleischfresser eigentlich nur das Zähneknirschen (siehe Tabellen).

Zu den Versuchen Nr. 7, 8, 12, 17, 18, 21, 22 brauche ich wohl nicht viel mehr zu sagen. Die Veronaldosis wurde so klein gewählt, um in diesen Versuchen, bei denen es ja lediglich auf die Beeinflussung der durch den Wärmestich hervorgerufenen Temperatursteigerung ankam, nicht durch Abkühlung getäuscht zu werden, die bei Kaninchen bekanntlich schon eintritt nach nur kurzdauernder Seiten- oder Bauchlage (z. B. infolge Veronalwirkung durch Parese der Hinterbeine).

Jetzt noch einige Worte über den Sektionsbefund. In Übereinstimmung mit dem in den Fällen von akuter Veronalvergiftung am Menschen so oft erhobenen Befund (teils klinisch, teils pathologisch-

---

[1]) Über die pharmakologische Bedeutung der bigeminierten Äthylgruppen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Supplem.-Bd. 1908 (Schmiedeberg-Festschrift), 181 ff.

anatomisch) fanden sich — wie aus den Tabellen hervorgeht, bei den meisten an der Vergiftung gestorbenen Tieren fast durchweg charakteristische Veränderungen am Respirationsapparat, besonders der Lungen, doch auch der Bronchien, der Trachea, des Larynx.

Die Lungenveränderungen wiesen — in größeren und kleineren, z. T. konfluierenden Herden alle Merkmale der hypostatischen, bzw. katarrhalischen oder Aspirations-Pneumonie auf, ganz besonders natürlich in den Lungenlappen derjenigen Seite, auf der das Tier lag. (Näheres s. Tabellen). In Larynx, Trachea und Bronchien fanden sich in all diesen Fällen (1, 4, 9, 26, 28, 29) sowie in den Kontrollversuchen (1 u. 2) Schleim, ferner zwischen den Knorpelringen starke arterielle Gefäßinjektion. In Versuch Nr. 24 (s. o., Text) fand sich nichts von all diesen Veränderungen. Die in einigen Sektionsberichten der Tabellen erwähnten Ecchymosen der Magenschleimhaut (gegenüber der Speiseröhrenmündung) sind wohl auf direkte Läsion der Schleimhaut durch das Anstoßen der Spitze des Magenschlauches zurückzuführen, wofür die Lokalisation spricht. Auffällig war in Versuch Nr. 24 die ausgeprägte streifenförmige Hyperämie der Duodenalschleimhaut. Daß die erwähnten Lungenveränderungen sich zwar in allen langsamer verlaufenden Vergiftungen finden, dagegen nicht in schnell verlaufenden (Versuch Nr. 24), stimmt mit den beim Menschen erhobenen Befunden überein. Auch hier hat man diese hypostatischen, bzw. katarrhalischen oder Aspirationspneumonien bei Veronalvergiftungen — teils klinisch, teils klinisch und pathologisch-anatomisch — festgestellt. Ja man muß (wenigstens in einigen Fällen) diesen Lungenveränderungen mehr als der spezifischen Giftwirkung des Veronals auf das Zentralnervensystem die Schuld am Tode zuschreiben, besonders in den Fällen, wo mehr als 2 Tage bis zum Eintritt des Todes vergingen. Diese Pneumonien müssen wir als mittelbare Folge der Veronalvergiftung ansehen. Da in dem durch das Veronal hervorgerufenen Koma die Atemtätigkeit — wie aus den Ziffern der Tabellen für Frequenz und Tiefe der Atemzüge hervorgeht — stark geschädigt, der Husten- und Niesreflex bedeutend herabgesetzt oder sogar ganz aufgehoben ist, so findet nicht nur ungenügende oder keine Expektoration normalen Sekretes, sondern Aspiration von Speichel statt. Es scheint auch fast, als ob unter dem Einflusse des Veronals überhaupt eine Vermehrung der normalen Sekretion der Speicheldrüsen sowohl als auch der Schleimhäute der Luftwege einträte. Dafür spricht vor allem das besonders bei den Katzenversuchen so oft beobachtete bald nach der Applikation des Giftes eintretende Lecken der Nase, die Salivation, das Niesen (in Versuch Nr. 4 z. B. 10 Minuten post applicat.) vor Eintritt des Komas (siehe Tabellen).

Nachzutragen bleibt nun noch Versuch Nr. 16, ein Blutdruckversuch.

Er wird der besseren Übersicht wegen in der folgenden Tabelle registriert.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche.	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectal-temperatur in Grad C	Bemerkungen
16. Katze, 2,23 kg, 20. II. 08. 12^{20}. 0,781 g Veronal, gelöst in 100 ccm H_2O von ca. 45° C per Magenschlauch, = 0,35 g Veronal pro Kilogramm	12^{22}	191	—	—	—	Atmung kleiner, irregulär
	12^{29}	201	—	—	—	—
	12^{30}	—	—	—	—	Starke Unruhe, die zirka 13 Minuten anhält. Dabei schwankt die Größe d. In- u. Exspiration und — ihnen entsprechend — der Blutdruck hin und her. Das Tier wirft sich in Krämpfen auf dem Brett hin und her. Die Atmung ist 12^{50} schon sehr klein
	12^{34}	beginnt zu sink.	—	—	—	
	12^{50}	133—134	132	18	—	
Atmung: 160 pro Minute; Puls: 160 pro Minute; Rektaltemp.: 39,1° C } s. Kurve	1^{15}	149—150	141	7	34,2	Die geringe Steigerung des Blutdruckes ist wohl als Folge des durch Einlegen des Thermometers bedingten Reizes anzusehen
	1^{22}	sinkt wieder	—	—	—	
	1^{27}	110	—	—	—	
	1^{33}	178	—	—	33,7	Dem Tier wird die Luftzufuhr abgeschnitten. Daher Druckanstieg
	—	—	—	—	—	Nach Freigabe der Luftzufuhr sinkt der Blutdruck wieder, steigt nach Kneifen in den Schwanz auf 127 mm Hg, sinkt dann wieder
	1^{38}	115	—	—	—	
	1^{50}	—	—	—	< 33,5	
	1^{55}	87	—	—	—	

Jetzt beginnt eine höchst merkwürdige Erscheinung sich zu zeigen, nämlich eine sehr auffällige Periodizität im Hin- und Her- bzw. Auf- und Niederschwanken des Blutdruckes, ohne ersichtliche Ursache, ganz spontan. Der Druck schwankt in den nächsten 5 Minuten zwischen 112 mm im Mittel und 151 mm im Mittel etwa $7^1/_2$mal auf und ab. Von Gipfel zu Gipfel sind etwa 40 Sekunden, ebenso von Tal zu Tal. Jeder Wellenberg umfaßt 3 kleine, den Atemphasen entsprechende Perioden (zusammen = etwa 20 Sekunden), ebenso jedes Wellental. Die Pulsfrequenz beträgt 120 pro Minute, die Atemfrequenz 10. Eine große Periode (1 Wellental + 1 Wellenberg)

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	Bemerkungen
16. Fortsetzung	3^{00}	92	—	—	—	Aufhören der Periodizität des Blutdruckes
	4^{00}	—	80	6	30,0	Atmung wird allmählich immer flacher
	4^{15}	—	—	—	29,7	
	4^{17}	—	—	—	—	Luftzufuhr wird von neuem abgeschnitten, diesmal folgt jedoch kein Anstieg des Blutdruckes
	4^{25}	—	74	—	—	—
	4^{40}	—	—	—	27,1	—
	4^{52}	steigt von 81 auf 134	—	Atmung sistiert völlig	—	Kompression d. Bauchaorta. Blutdruck steigt, nach Aufhören d. Kompression sinkt er wieder (auf 72 mm Hg)
	—	72				
	4^{53}	steigt auf 179 nach Aufhören der Aortenkompression 77	—	—	—	Zweite, längere Kompression d. Bauchaorta. Druck steigt. Er sinkt nach Aufhören d. Kompression akut auf 77 mm
	4^{54}	steigt auf 141 im Mittel (147 maximal). Dann allmähliches Absinken auf 72		Atmung setzt spontan wieder ein		Jetzt setzt die Atmung spontan wieder ein, der Blutdruck steigt spontan, sinkt aber dann allmählich wieder ab
	5^{00}	s. Bemerkungen	—	—	—	Harn abgedrückt. Dies macht Wiederansteigen des Blutdruckes, Tieferwerden der Atmung
	5^{03}	do.	—	—	—	Aufhören des Druckes auf die Blase. Der Blutdruck bleibt noch kurze Zeit hoch
	5^{05}	137 (maximal 160)	89 Vaguspulse	10 viel tiefer als vorher	—	Ausgesprochene Vaguspulse
	5^{10}	steigt nicht wesentlich	—	—	—	Erneute Kompression der Bauchaorta
	5^{13}	—	—	—	28	
	5^{15}	sinkt allmählich	—	—	—	Erwärmung d. Tieres durch eine über seinem Bauche angebrachte Glühlampe
	5^{17}	—	—	—	—	Kneifen in den Schwanz, Kitzeln in der Nase erfolglos
	5^{20}	—	—	—	28,3	
	5^{25}	78				

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	Bemerkungen
16. Fortsetzung	5^{24}	steigt auf 195,	—	—	—	Wieder Luft abgeschnitten.
	—	sinkt dann auf 79	—	sistiert	—	Blutdruck steigt. Nach Aufhören der Erstickung Absinken
	5^{33}	121	—	—	—	Künstliche Atmung m. Luft. Danach Selbstatmung m. O_2
	5^{36}	—	—	Spontanatmung. 11 mit O_2	—	Wieder Luftatmung spont. Entschied. tiefer. Spontanatmung mit O_2. Von 5^{40} an wieder periodisches
	5^{40} 5^{41}	von jetzt ab wied. periodisch, nach Entfernung des O_2 nicht mehr	75	7		Schwanken des Blutdruckes, das nach Entfernung des O_2 aufhört
	5^{48}	—	—	—	—	Bauchhöhle eröffnet
	5^{50}	steigt infolge Betasten d. Netzes, steigt weiter auf Nebennierenreiz.	—	—	28,7	
	5^{55}		—	—	—	Verblutenlassen des Tieres durch Durchschneiden der Bauchaorta

umfaßt so etwa 6 kleine den Atemphasen entsprechende Perioden, und dauert etwa 40 Sekunden. Diese (zunächst ziemlich ungleich) großen Perioden werden schon nach Ablauf von 5 Minuten nach Beginn der Periodizität überhaupt allmählich immer weiter bis zu einer maximalen Entfernung zweier Bergmitten von $3^1/_2$ Minuten bei einer Breite des Tals von 3 Minuten 10 Sekunden. Die Berge umfassen auch hier 2 bis 3, die Täler dagegen 16 bis 20 kleine, den Atemphasen entsprechende Perioden. Dabei beträgt die Pulsfrequenz 94 pro Minute, die Atemfrequenz 6 pro Minute, der mittlere Blutdruck im Tale 92 mm, im Berge 110 mm Hg.

Dieses eigentümliche periodische Hin- und Herschwanken des Blutdruckes erinnert stark an das spontane Hin- und Herschwanken der Weite der Pupille bei der Katze in Versuch 4, wie es in Spalte 4, 11^{36} notiert ist. Ich werde hierauf nach vollständiger Beschreibung des Falles noch einmal zurückkommen.

Die Periodizität hält im ganzen bis 3^{00} nachm. an, d. h. also etwas mehr als 1 Stunde. Von 3^{00} ab hört die Periodizität auf, und es bleiben lediglich noch die gewöhnlichen, den Atemphasen entsprechenden Druckschwankungen. Der Blutdruck hält sich nur 1 Stunde lang auf der mittleren Höhe von 92 mm Hg.

Die oben erwähnte merkwürdige Erscheinung der Blutdruckschwankungen macht im Verein mit den in Fall 4 erwähnten spontanen Schwankungen der Pupillenweite folgende Erklärung wahrscheinlich: Man könnte sich vorstellen, daß dieses Schwanken des Blutdruckes zustande käme durch ein starkes Hin- und Herschwanken in der Weite der Bauchgefäße. Es würde sich also um einen direkten Einfluß des Veronals auf die glatte, bzw. Gefäßmuskulatur, oder die Nerven dieser Gefäße, bzw. dieser glatten Muskulatur handeln. Hier ist auch an die in Versuch Nr. 2, Spalte 4, 8^{00}, erwähnte, durch die Bauchdecken hindurch sichtbare, gesteigerte Darmperistaltik zu erinnern!

Das Aufhören der Periodizität scheint auf eine komplette Lähmung der Bauchgefäße hinzudeuten, das Wiederauftreten nach O_2-Atmung auf eine partielle Erholung, die indessen möglicherweise schon eingeleitet worden war durch die langdauernde Kompression der Bauchaorta (s. o. 4^{53}). Denn selbst nach Aufhören der Kompression und darauf folgendem momentanem Druckabfall steigt der Blutdruck erheblich spontan, und die Atmung wird besser. Auch dieser günstige Einfluß der Bauchaorta-Kompression scheint die obige Annahme einer Lähmung der Muskulatur bzw. der Nerven der Bauchgefäße durch das Veronal zu bestätigen. Denn als primäre Wirkung dieser Kompression könnte man sich vorstellen eine direkte, rein mechanische Entlastung der Bauchgefäße von der Last des Blutes, zweitens aber auch infolge der durch die Kompression bedingten vermehrten Füllung des Herzens eine bessere Ernährung des Zentralnervensystems, vor allem des Atemzentrums.

Als praktische Gesichtspunkte ergeben sich aus diesen Versuchen folgende:

1. Das Veronal ist bei weitem giftiger, als bisher angenommen wurde (für Kaninchen und Katzen 3 bis 4mal, für Hunde 2 bis $2^1/_2$mal giftiger). Es ist also ratsam, es dem

Handverkaufe völlig zu entziehen, es auch nicht „ad libitum" zu repetieren.

2. Das Veronal ist geradezu kontraindiziert bei allen Erkrankungen, die an sich mit Schädigungen der Gefäßfunktionen einhergehen (z. B. bei Typhus abdominalis usw.) wegen seiner Wirkung auf die Bauchgefäße.

In etwaigen Vergiftungsfällen bestände die Therapie in geeigneter Belastung des Bauches und dadurch bedingter, wenigstens partieller Kompression der Bauchgefäße bzw. Bauchaorta, außerdem in O_2-Atmung.[1]) Angezeigt erscheint noch möglichstes Warmhalten des Patienten, um zu starkes Absinken der Eigenwärme zu verhindern bzw. einigermaßen auszugleichen.

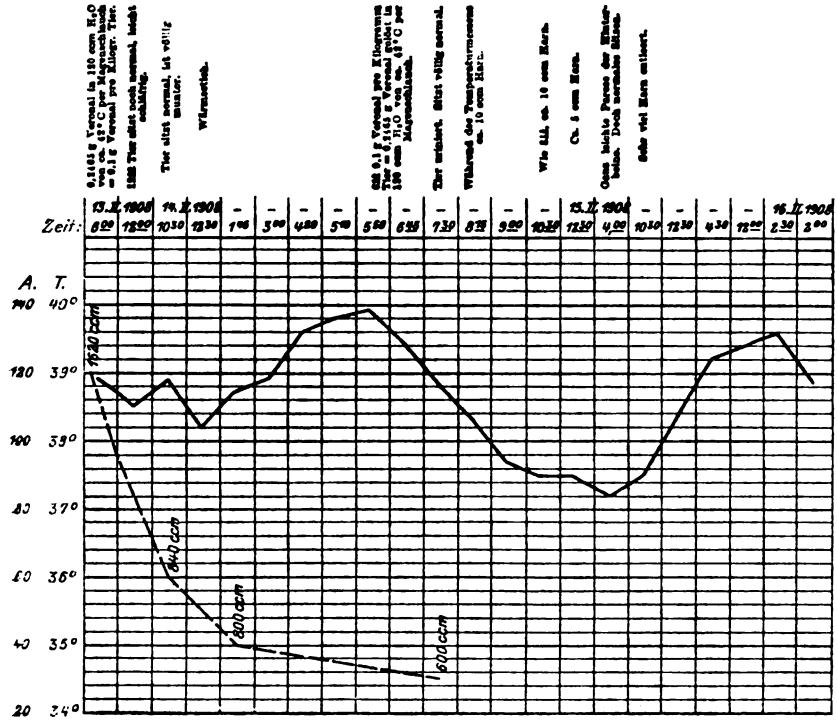
Die Zeiten sind in den Tabellen genau so bezeichnet wie in Eisenbahn-Fahrplänen. Es heißt also: 6^{22} sechs Uhr abends, 6^{00} sechs Uhr morgens. Die Minutenziffern der Nacht (6^{22} bis 6^{00}) sind also unterstrichen.

Herrn Geheimrat Jacobj sage ich für sein freundliches Interesse und seine liebenswürdige Unterstützung, die er mir bei dieser Arbeit zuteil werden ließ, meinen verbindlichsten Dank.

---

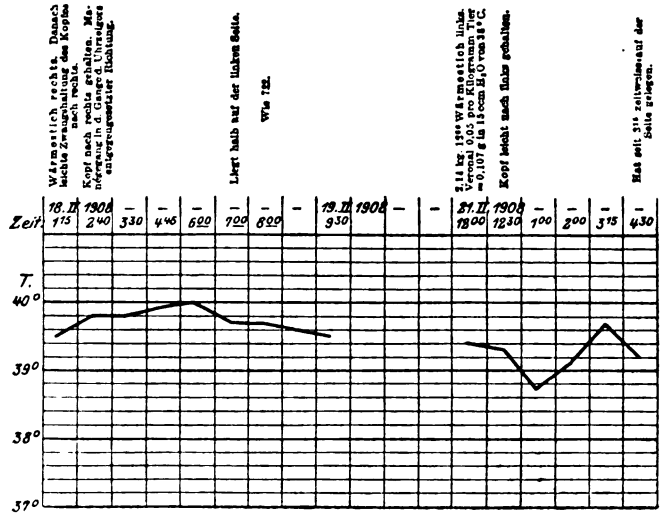
[1]) Abgesehen natürlich von Magenspülungen usw. in ganz frischen Fällen.

Versuch 7 und 8. Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,465 kg. 1. Atmung: 120 pro Minute = 1620 ccm. 2. Puls: 200 pro Minute. 3. Rectaltemperatur: 38,9° C.

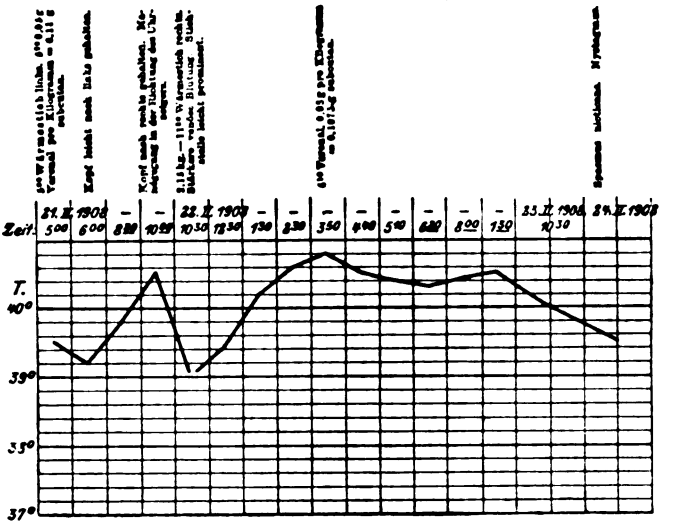


Am 18. II. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: Kein wesentlicher Befund (auch mit Ausnahme der Zerstörungen durch den Wärmestich im Gehirn nicht!) äußer starker arterieller Hyperämie der Trachea und der Bronchien.

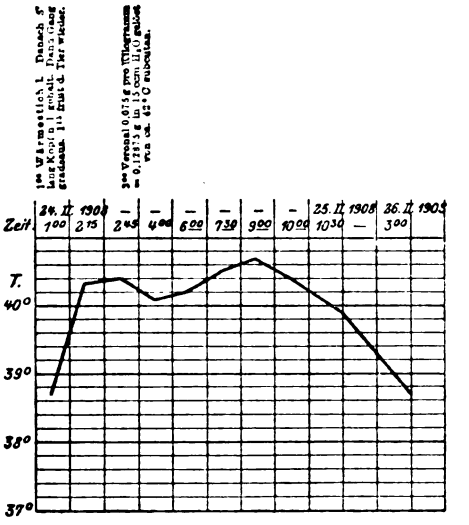
Versuch 12 u. 17. Tierart, Tiergew.: Kaninchen, 2,58 kg. Rectaltemp.: 39,5° C.



Versuch 18 und 21.
Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,2 kg.
Rectaltemperatur: 39,5° C.
Gibbus der Lendenwirbelsäule.



Versuch 22.
Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,25 kg.
Rectaltemperatur: 38,7° C.



Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
1. Kaninchen, 3,5 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1920 ccm 2. T. 39,1 12. II. 08 5^{50} 1,225 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 12. II.	6^{30}	Seitenlage ertragen, Reflexe erhalten	—	—	—	13. II. 08 8^{00} tot vorgefunden. Sektion: In der Magenschleimhaut an der großen Curvatur gegenüber der Einmündungsstelle des Ösophagus einige (wohl durch die Spitze d. Magenschlauches verursachte) Ecchymosen. Duodenum frei. Larynx hyperämisch. Darin etwas Schleim. Zwischen den Trachealringen starke arterielle Gefäßinjektion. Lunge o. B.
		8^{00}	Schmerzleitung erhalten, Reflexe erhalten, Lichtreaktion der Pupillen etwas träge. Fester Schlaf.	50 p′ = 900 ccm	240 p′	37,1	
		9^{45}	Tiefer Schlaf. Trachealrasseln, Zähneknirschen	—	—	—	
	13. II.	2^{00}	Tiefer Schlaf. Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Trachealrasseln. Pupillen wie oben. Schmerzleitung sehr stark verlangsamt, fast aufgehoben	40 p′ = 640 ccm	244 p′	36,8	
		8^{00}	Tot vorgefunden	—	—	—	
2. Kaninchen, 2,87 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1800 ccm 2. T. 38,7 12. II. 08 6^{00} 0,7175 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	12. II.	6^{30}	Seitenlage ertragen, Reflexe erhalten	—	—	—	Nach 10 Tagen noch immer weithin hörbares Rasseln. Deutliche Bronchitis. Im übrigen erscheint d. Tier völlig normal, frißt m. Appetit usw. Schließlich kompl. Heilung
		8^{00}	Schläft fest. Schmerzleitung erhalten, starke Darmperistaltik, durch die Bauchdecken hindurch brillant sichtbar. Lichtreaktion der Pupillen etwas träge	50 p′ = 1150 ccm	232 p′	37,5	
	13. II.	2^{00}	Tiefer Schlaf. Trachealrasseln, Zähneknirschen, beides weithin hörbar. Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Pupillenreaktion auf Licht etwas träge. Schmerzleitung stark verlangsamt, beinahe aufgehoben	100 p′ = 850 ccm	228 p′ irregul., inäqual.	36,7	

		10^{30}	Tier schläft noch fest. Von Zeit zu Zeit hustenartige Atemstöße. Schmerzleitung stark verlangsamt (s. o.). Pupillen wie oben. Trachealrasseln	120 p′ = 1380 ccm	280 p′	—	
		3^{30}	Schläft noch, noch Trachealrasseln. Befund unverändert	120 p′ = 1560 ccm	280 p′	38,5	
		12^{00}	Das Tier ist erwacht, sitzt, wenn auch infolge Parese der Hinterbeine noch unvollkommen	—	—	38,5	
	14. II.	10^{30}	Tier sitzt normal, putzt sich, frißt Kot, erscheint völlig munter. Doch noch immer Trachealrasseln	120 p′ = 1080 ccm	240 p′	38,8	
3. Kaninchen, 2,47 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1320 ccm 2. T. 39,1 12. II. 08 5^{45} 0,494 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	12. II.	7^{00}	Parese der Hinterbeine	—	—	—	
		8^{00}	Wie 7^{00}.	—	—	—	
		8^{45}	Tier schläft. Seitenlage. Prompte Lichtreaktion der Pupillen	75 p′ = 1012 ccm	200 p′	38,3	Heilung
	13. II.	2^{00}	Status idem. Nur ist die Pupillenreaktion auf Licht träge geworden. Kein Trachealrasseln, kein Zähneknirschen. Schmerzleitung verlangsamt	50 p′ = 700 ccm	228 p′ irregul., inäqual.	37,5	
		10^{30}	Status idem. Pupillen lichtstarr, Cornealreflex erhalten	60 p′ = 900 ccm	240 p′	37,2	
		3^{30}	Das Tier ist erwacht, sitzt normal, ist völlig munter, frißt. Die Pupillen reagieren. Kein Trachealrasseln	—	—	—	
4. Katze, graugelb, 2,945 kg 1. Atmung: 20 p′ = 680 ccm 2. T. 38,3 14. II. 08 11^{10} 1,0325 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier	14. II.	11^{30}	Das Tier ist deutlich trunken, sehr aufgeregt, taumelt lebhaft im Käfig hin und her, ist außerstande, sich auf den Beinen zu halten. Parese aller 4 Extremitäten, der hinteren > der vorderen	—	—	—	17. II. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: Tier noch warm. Totenstarre. Ecchymosen im Magen an der großen Curvatur gegenüber d. Einmündungsstelle d. Ösophagus. Im Larynx etwas schleim.-eitriges Sekret. Larynx und
		11^{33}	Nach Anfassen am Nackenfell reflektorischer Opistotonus. Tier erträgt Seitenlage. Pupillen maximal erweitert, kreisrund, völlig lichtstarr	—	—	—	
		11^{36}	Pupillen reagieren wieder, wenn auch sehr träge. Dagegen schwankt ihre Weite spontan in sehr weiten Grenzen lebhaft hin und her. Zeitweise spontaner Opistotonus — meist nach rechts besonders stark ausgeprägt. Tier schließt die Augen. Hustenartige Atemstöße	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 19.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
4. Fortsetzung	1908 14. II.	11^{40}	Starker Erschütterungsreflex des jetzt ruhigen Tieres, das inzwischen auf den Tisch gelegt worden war. Starkes Zucken nach Schlag auf den Tisch. Das Tier leckt beständig seine Nase, Salivation	ca. 30 bis 35 p′	—	—	Trachea nicht so deutl. hyperämisch wie etwa in Fall 1. In der rechten Lunge viele größ. u. kleinere blaurote, derbere Stellen, innerhalb deren d. Alveolen luftleer sind. Daneben lufthaltiges Lungengewebe. (Das Tier lag auf der rechten Seite.) In der linken Lunge auch solche Herde wie rechts, doch weniger u. kleinere. — In den Bronchien reichl. dünnflüssig-schleimig-sanguinolent. Sekret
		11^{45}	Tremor und Spasmen in den Extremitäten. Ohrmuschelreflex (Wippen der Ohrmuschel nach Kitzeln bzw. Berührung der Haarspitzen an der Innenfläche der Muschel) äußerst lebhaft. Schmerzleitung verlangsamt	—	—	—	
		11^{50}	Schwimm- und Tretbewegungen	—	—	—	
		12^{00}	Tier läßt die Zunge teilweise aus dem Maule heraushängen	—	232 p′	—	
		12^{10}	—	—	—	37,3	
		12^{35}	Trismus	30 p′ = 720 ccm	—	—	
		12^{40}	Reflexe schwächer. Zunge hängt weit aus dem leicht geöffneten Maule heraus	—	—	—	
		12^{45}	Unterkiefer hängt schlaff herab. Schmerzleitung (nach Kneifen in den Schwanz) stark verlangsamt. Schlaf	16 p′	—	—	
		1^{15}	Pupillen maximal verengt, strichförmig, und völlig reaktionslos. Corneal-, Ohrmuschel- und Erschütterungsreflex = 0. Lidreflex (s. Text) erhalten. Koma	14 p′ = 120 ccm	—	35,0	Dura mater z. T. dem Schädeldache fest adhärent
		1^{50}	Lidreflex noch erhalten	8 p′	126 p′	—	Im Harn fand sich weder Eiweiß noch Zucker
		2^{05}	Lidreflex abgeschwächt	—	—	—	
		3^{45}	Lidreflex eben noch auslösbar, Schnurrhaarreflex (s. Text) auf mäßigen Reiz noch deutlich	6 p′	102 p′	—	

		5^{50}	Serie von Hustenstößen. Danach Lidreflex wieder leichter auslösbar. Niesreflex — durch Kitzeln in der Nase mit einer Feder — nur schwer zu erhalten	—	—	—	
		7^{00}	—	4 p′	84 p′	<33,5	
	15. II.	12^{00}	Koma unverändert. O_2 gegeben, 3 l pro Minute. Danach sinkt die Atemfrequenz bald auf 6 pro Minute, steigt indessen bald wieder auf 8 p′. Harn abgedrückt. Danach Erschütterungsreflex besser als vorher auslösbar. Vorder- u. Hinterbeinreflex besser. Atmung etwas tiefer, einzelne Hustenstöße. Trachealrasseln	8 p′ 6 p′ 8 p′	—	—	
		2^{00}	$^1/_2$ Stde. lang künstliche Atmung gemacht. Danach Anstieg der Temp. von 24,6 auf 26,0° C, der Niesreflex ist leichter auslösbar. Trachealrasseln. Durch Auslösen von Niesen u. Hustenstößen (durch Kitzeln in der Nase) wird Schleim aus Nase und Trachea herausbefördert. — Das Tier wird zugedeckt	6 bis 8 p′	—	24,6 26,0	
		4^{30}	Ohrmuschelreflex angedeutet. Schmerzleitung desgl. Pupillen etwas weiter, reichl. klonische Zuckungen	16 p′	—	36,2	
	16. II.	12^{30}	Trachealrasseln, Reflexe erloschen	32 p′	—	—	
		2^{30}	„ „ „	52 p′	—	—	
		11^{00}	Reflexe z. T. wieder auslösbar, Trachealrasseln. Bronchitische Geräusche. Hält man das Tier an den Hinterbeinen, mit dem Kopfe nach unten hängend, so fließt etwas schleimig-eitriges Sekret aus dem Maule	60 p′	—	34,6	
		8^{00}	—	72 p′	—	32,0	
	17. II.		Früh tot vorgefunden				
5. Katze, schwarz, 2,59 kg 1. Atmung: 40 pro Minute = 1160 ccm	14. II.	3^{45}	Pupillen deutlich enger, als sogleich post applicationem	—	—	—	17. II. 08 komplette Heilung
		4^{20}	Tier kann nicht mehr sitzen, Parese besonders der Hinterbeine. Das Tier reagiert aber noch auf Anruf, schnurrt, wenn es gestreichelt wird. Er-	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 21.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
5. (Fortsetzung) 2. T. 38,8 14. II. 08 3^{30} 0,6475 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 14. II.		schütterungsreflex sehr lebhaft. Pupillen reagieren prompt auf Licht				s. vorige Seite
		4^{40}	Schlaf. Augen nicht völlig — nur ca. halb — geschlossen. Erschütterungsreflex herabgesetzt, ebenso Ohrmuschelreflex. Lidreflex noch lebhaft. Schmerzleitung erhalten	—	—	—	
		5^{20}	Schmerzleitung noch prompt	30 p′ = 555 ccm	—	36,1	
		6^{00}	Koma. Pupillen maximal verengt, strichförmig, völlig lichtstarr. Niesreflex kaum noch auszulösen. Corneal-Ohrmuschelreflex erloschen, Schnurrhaarreflex deutlich. Schmerzleitung stark verlangsamt	—	—	—	
		7^{10}	Pupillen sind weiter als 6^{00}, reagieren auf Licht. Das Tier leckt sich die Nase. Salivation. Klonische Zuckungen am ganzen Körper. Das Tier hustet zuweilen	20 p′ = 400 ccm	—	33,6	
		8^{15}	Pupillen reagieren. Alle Reflexe vorhanden, und zwar gesteigert. Schmerzleitung prompt. Starke Salivation	—	—	<33,5	
	15. II.	12^{30}	Enorme Reflexsteigerung, auch gegen Schall. Pupillen weit, reagieren prompt. Starke Jaktationen, Schwimm- u. Tretbewegungen. Noch Narkose	—	—	—	
		11^{45}	Starke Jaktationen, Opistotonus, Schwimmbewegungen, Pupillen stark verengt, fast strichförmig	—	—	—	
		12^{10}	Nach einem vergeblichen Versuch, Harn durch Abdrücken zu gewinnen, werden die Pupillen weiter, das Tier versucht, sich aufzurichten, faucht. Nach weiterer Bauchmassage kräftige Spontanbewegungen der Beine. Plötzlich allgemeiner	28 p′			

			Tetanus, Pupillen weit, starr. Nach Abklingen des Tetanus (nach ca. 30″) Pupillen eng. Tier bewußtlos				
		1^{00}	—	—	—	37,7	
		1^{15}	Klonische Krämpfe	—	—	—	
		4^{40}	Noch immer zeitweise Krämpfe. Noch bewußtlos	—	—	—	
	16. II.	12^{30}	Noch zuweilen Opistotonus. Tier reagiert spurweise auf Anruf	—	—	—	
		6^{00}	Tier hebt spontan den Kopf, liegt noch in Seitenlage, reagiert jetzt prompt auf Anruf. Extremitäten noch immer ataktisch, paretisch	—	—	—	
		2^{00}	Tier sitzt, schnurrt. Noch leichte Ataxie der Hinterbeine	—	—	38,2	
		8^{00}	do.	—	—	38,5	
	17. II.		Tier völlig normal				
6. Katze, weißbunt, 1,415 kg 1. Atmung: 33 p′ = 833 ccm 2. T. 39,1 15. II. 08 4^{00} 0,283 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	15. II.	4^{20}	Beginnende Unsicherheit im Gehen und Stehen, besonders der Hinterbeine	—	—	—	16. II. 08 abends 8^{00} komplette Heilung (nach 16 Stdn.)
		4^{30}	Seitenlage. Das Tier ist nicht zu bewegen, aufzustehen	—	—	—	
		5^{00}	Hier und da krampfhafte Zuckungen, Opistotonus, Spasmen der Beine. Erschütterungsreflex gesteigert. Pupillen weit, reagieren prompt auf Licht. Cornealreflex gesteigert, ebenso Lid- und Ohrmuschelreflex lebhaft	—	—	—	
		5^{15}	Tret- und Schwimmbewegungen. Jaktationen	—	—	—	
	16. II.	12^{30}	Wie 15. II. 08 5^{15}	24 p′ = 480 ccm	—	37,3	
		2^{30}	Noch immer Jaktationen, Opistotonus, Tier reagiert etwas auf Anruf	—	—	37,2	
		2^{00}	Bis auf eine leichte Ataxie der Hinterbeine ist das Tier normal	—	—	37,4	
		8^{00}	Keine Ataxie mehr. Völlig normal. Sanatio	—	—	38,9	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 23.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
9. Kaninchen, 4,13 kg 1. Atmung: 60 p′ = 1470 ccm 2. T. 39,7 Tier wurde 2 Tage lang hungern gelassen (mit Maulkorb). Darauf am 17. II. 08 7^{25} 1,45 g Veronal, gelöst in 58 ccm H_2O von ca. 42° C per Magenschlauch=0,35g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 17. II.	8^{40}	Seitenlage rechts. Pupillen weit, reagieren prompt, Schmerzleitung prompt	—	—	—	18. II. 08 9^{00} tot vorgefunden. Sektion: Noch warm. Totenstarre. Schleimige Auflagerungen auf der Magenschleimhaut. Im Magen reichl. Flüssigkeit, geringe Futterreste. Lungen: Rechte L. stark hyperämisch. Alveolen an den am stärksten hyperäm. Stellen luftleer. In Trachea und Bronchien etw. Schleim, starke arterielle Gefäßinjektion zwisch. den Ringen
		9^{00}	Lebhaftes Zähneknirschen, Erschütterungsreflex lebhaft. Mäßige Jaktationen. Pupillenreaktion träger. Schmerzleitung verlangsamt. Husten, Tier liegt in festem Schlaf. Trachealrasseln. Salivation. Lid-Schnurrhaarreflex stark herabgesetzt. Bronchitische Geräusche?	50 p′ = 1000 ccm	240 p′	35,3	
	18. II.	9^{00}	Tot vorgefunden, noch warm				
10. Kaninchen, 2,26 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1620 ccm 2. T. 38,9 2 × 24 Stdn. Hunger (Maulkorb). Danach am 17. II. 08 7^{25} 0,565 g Veronal, gelöst in 22,5 ccm H_2O von ca. 42 bis 45° C	17. II.	8^{30}	Seitenlage. Pupillen weit, reagieren kaum auf Licht. Schmerzleitung gut erhalten	—	—	—	19. II. 08 komplette Heilung
		9^{00}	Lebhaftes Zähneknirschen, Trachealrasseln, Husten. Pupillen fast lichtstarr. Schmerzleitung etwas verlangsamt. Cornealreflex abgeschwächt. Lid-Schnurrhaarreflex prompt. Spasmen in den Beinen, mäßige Jaktationen. Tiefer Schlaf. Bronchitische Geräusche	40 p′ = 560 ccm	240 p′	35,1	
		11^{00}	Krampfartige Hustenanfälle	—	—	—	
	18. II.	9^{00}	Schläft noch. Ohne Jaktationen	—	—	34,5	

per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier		3^{45}	Tier liegt noch. Kein Trachealrasseln mehr. Hier und da noch etwas Zähneknirschen. Gegen Hochheben an den Ohren wehrt sich das Tier energisch. Schmerzleitung gut, Reflexe normal	120 p′ = 1380 ccm	—	37,7	
	19. II.	9^{00}	Völlig erholt	—	—	—	
11. Kaninchen, 2,0 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1200 ccm 2. T. 39,6 2 × 24 Stdn. Hunger (Maulkorb). Danach am 17. II. 08 7^{20} 0,4 g Veronal, gelöst in 16 ccm H_2O von ca. 42 bis 45° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	17. II.	8^{20}	Seitenlage. Pupillen weit, reagieren prompt auf Licht. Schmerzleitung gut erhalten	—	—	—	19. II. 08 komplette Heilung
		9^{00}	Zähneknirschen. Erschütterungsreflex deutlich gesteigert. Pupillen reagieren. Schmerzleitung gut erhalten. Trachealrasseln, Husten. Lid-Schnurrhaarreflex prompt. Jaktationen. Spasmen in den Beinen	40 p′ = 560 ccm	200 p′	35,6	
	18. II.	9^{00}	Noch Seitenlage, doch kein Schlaf mehr	—	—	—	
		10^{00}	Tier versucht, sich aufzurichten. Noch starke Parese der Hinterbeine	—	—	—	
		3^{45}	Tier sitzt mit nicht völlig untergezogenen Hinterbeinen, die noch leicht paretisch sind. Sonst munter	60 p′ = 990 ccm	—	39,3	
	19. II.	früh	Völlig erholt	—	—	—	
23. Katze, 2,06 kg 1. Atmung: 20 p′ = 680 ccm 2. T. 38,9 24. II. 08 12^{40} 0,515 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 42° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	24. II.	1^{00}	Seitenlage. Klonische Krämpfe, Jaktationen. Leckt sich die Nase, niest. Salivation. Tier ist sehr aufgeregt. Macht vergebliche Versuche, sich aufzusetzen. Pupillen sehr weit, reagieren prompt. Erschütterungsreflex sowie die übrigen Reflexe erheblich gesteigert	—	—	—	26. II. 08 komplette Heilung
		1^{30}	Die Jaktationen sistieren. Tier schläft tief. Zunge hängt z. T. aus dem Maule. Schmerzleitung = 0. Pupillen mittelweit, reagieren. Erschütterungsreflex nicht mehr auszulösen. Ohrmuschel-, Lid- und Schnurrhaarreflex prompt	—	—	—	
		4^{20}	Pupillen maximal verengt, strichförmig. Nach Einführung des Thermometers in den Anus werden die Pupillen etwas weiter. Husten	—	—	32,4	
		5^{45}	Pupillen weiter. Leichte Spasmen in d. Extremitäten	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 25.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
23. Fortsetzung.	1908 24. II.	7^{30}	Jaktationen, Hustenparoxysmen	20 p′	—	29,4	s. vorige Seite
	25. II.	10^{30}	Tier sehr aufgeregt, heult laut. Schwimm- und Tretbewegungen. Opistotonus	—	—	35,9	
		7^{00}	Status idem				
	26. II.	früh	Tier völlig normal	—	—	—	
25. Katze, 1,75 kg 1. Atmung: 40 p′ = 1400 ccm 2. T. 39,0 28. II. 08 4^{05} 0,5925 g Veronal + 0,5925 g Na_2CO_3 in 25 ccm H_2O auf d. Wasserbade gelöst, per Magenschlauch, ca. 42° C warm = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier. Bei d. Applikation gehen ca. 6 bis 8 ccm der Lösung verloren, infolge heftig. Sträubens des Tieres	28. II.	4^{15}	Leichter Tremor des Kopfes	—	—	—	1. III. 08 komplette Heilung
		4^{20}	Leichte Parese der Hinterbeine. Erschütterungsreflex gesteigert	—	—	—	
		4^{25}	Tier sitzt noch, unsicher schwankend	—	—	—	
		4^{35}	Leichte Parese der Vorderbeine	—	—	—	
		4^{40}	Tier ist sehr unruhig, tobt aber nicht, hat nicht das starke Exzitationsstadium der bisherigen Katzen. Pupillen weit, reagieren	—	—	—	
		4^{45}	Hier und da Spasmen in den Beinen. Opistotonus angedeutet. Erschütterungsreflex stark gesteigert. Schmerzleitung verlangsamt. Tiefer Schlaf	—	—	—	
		5^{15}	Leckt sich beständig die Nase. Hustet, niest. Spontane Zuckungen. Zeitweise krampfhafte Bewegungen der Vorderbeine (spastisch-paretisch). 5^{30} Stat. idem	—	—	—	
		6^{30}	Nach Aufheben des Tieres am Nackenfell sehr starker, ausgeprägter Opistotonus u. teils klonische, teils tonische Krämpfe aller Extremitäten. Trismus angedeutet. Husten. Krampfhafte Atemstöße	—	—	—	

		8^{00}	Stat. idem. Pupillen etwas enger. 10^{00} Stat. idem	—	—	37,5	
	29. II.	10^{00}	Schläft noch, ist aber, mit Mühe zwar, zu erwecken	—	—	—	
	1. III.	früh	Tier völlig munter bis auf eine leichte Parese der Hinterbeine, die aber auch im Laufe des Tages noch schwindet	—	—	—	
26. Katze, 1,26 kg 1. Atmung: 40 p′ = 1040 ccm 2. T. 39.2.—28. II. 08 4^{15} 0,441 g Veronal aufgeschwemmt in 30,0 ccm 0,5 %iger Tragacanth-Lösg., kalt, per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro kg Tier Die Katze würgt bei der Applikation ca. 5 bis 6 ccm — schätzungsweise — neben dem Schlundrohr wied. heraus, erhält also re vera nur ca. 0,3 g Veronal pro Kilogramm Tier	28. II.	4^{25}	Parese der Hinterbeine	—	—	—	1. III. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: In Larynx, Trachea arter. Hyperämie. Lunge: bes. links bronchopneumon. Herde (wie in Fall 1)
		4^{30}	Tier läuft mit unkoordinierten Bewegungen taumelnd, aufgeregt im Käfig umher. Pupillen weit, reagieren prompt. Erschütterungsreflex gesteigert. Tier leckt sich beständig die Nase. Salivation	—	—	—	
		4^{35}	Seitenlage links. Schlaf				
		4^{40}	Leichter Opistotonus. Krampfhafte Bewegungen der Vorderbeine. Tier niest, leckt sich die Nase. Opistotonus durch Rupfen am Nackenfell leicht auszulösen. Pupillen weit, reagieren. Starkes Zusammenschrecken auf Schall	—	160 p′	—	
	29. II.	10^{00}	Starker Opistotonus, klonische Krämpfe, Hustenparoxysmen. Abends status idem	—	—	34,6	
	1. III.	früh	Tot vorgefunden				
Kontrollvers. Nr. 1. Katze, 2,0 kg 24. III. 08 11^{30} 0,6 g Veronal, gelöst in 70 ccm H_2O von 42 bis 45° C per Magenschlauch = 0,3 g V. pro Kilogr. Tier	24. III.	11^{35}	Erschütterungsreflex gesteigert	—	—	—	28. III. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: Ausgedehnte bronchopneumonische Herde bzw. Hypostasen in d. Lungen, bes. rechts, z. T. konfluierend. Die Bronchien, Trachea mit schleimig-eitrig., etwas blutigem Sekret erfüllt
		11^{50}	Sitzt eben noch, wenn auch schon stark schwankend. Fährt auf Händeklatschen stark zusammen	—	—	—	
		12^{00}	Reflexe maximal gesteigert	—	—	—	
		12^{10}	Seitenlage rechts	—	—	—	
		12^{30}	Reflexe herabgesetzt; tiefer Schlaf. Trachealrasseln. Das Koma dauert an bis 28. III. 08.	—	—	—	
	28. III.	früh	An diesem Tage morgens tot vorgefunden	—	—	—	
Kontrollvers. Nr. 2. Kaninchen, 1,79 kg 24. III. 08 11^{50} 0,537 g Veron., gel. in 70 ccm H_2O v. 42—45° C = 0,3 g V. pro 1 kg Tier	24. III.	12^{20}	Taumelt	—	—	—	25. III. 08 früh tot vorgefunden
		2^{00}	Seitenlage	—	—	—	
	25. III.	früh	Tot vorgefunden	—	—	—	

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in kg Datum, Zeit u. Anordnung des Versuches	Datum	Zeit	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung
27. Foxterrierhündin, 9,5 kg 29. II. 08 1^{20} 4,275 g Veronal, gelöst in 450 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,45 g V. pro 1 kg Tier	1908 29. II.	1^{30}	Parese der Hinterbeine. Tier sitzt taumelnd, jammert leise, taumelt zeitweise aufgeregt im Käfig umher
		1^{35}	Parese auch der Vorderbeine. Tier liegt in Bauchlage jammernd im Käfig, speichelt, leckt sich die Nase, hustet zeitweise
		1^{40}	Seitenlage rechts. Doch vermag sich das Tier, wenn auch unvollkommen, in Bauchlage zu drehen. Atmung 12 p′
		1^{45}	Exspiration stoßend. Leichter Opistotonus, leichte Spasmen der Vorderbeine, rechte Seitenlage
		1^{55}	Furchtbar heftiger Tetanus, der ununterbrochen bis 2^{13} dauert. Alle 4 Extremitäten sind steif ausgestreckt, besonders die vorderen, die, trotzdem das Tier in Seitenlage bleibt, hoch über den Boden gestreckt und völlig starr etwas nach hinten gehalten werden, ebenso der Schwanz. Krampfhafte, hustenstoßartige Exspirationen. Die Gelenke lassen sich nur unter Anwendung ziemlicher Kraft etwas biegen
		2^{10}	Status wie 1^{55}. Schnarchende Inspirationen, hustenstoßartige, mit Heulen verbundene Exspiration
		2^{13}	Langsames Abklingen des Tetanus beginnt
		2^{17}	Gelenke weich. — Pupillen bisher nicht zu beobachten, da Augen in vollkommener Schlafstellung
		2^{20}	Tier schnarcht. Exspiration stark stoßend. Atmung 33 p′, oberflächlich. Trotz Kopftieflage und Heraushängen der Zunge ist die Atmung sehr erschwert. Daher wird, um dem Tiere Luft zu schaffen, ihm ein Spundkork zwischen die Zähne geklemmt. Danach sofort Besserwerden der Atmung
		2^{35}	
		2^{40}	Atmung 22 p′, tiefer. Bald erfolgt ein weiterer Rückgang der Atemfrequenz auf ca. 13 bis 14 p′ (leicht irregulär). Dabei sind die Exspirationen ca. doppelt so lang wie die Inspirationen. Dauer einer Exspiration ca. 3″
		3^{45}	Atmung 8 p′. Biotsches Atmen. Am Ende der Apnoe gegen den Anfang der Inspiration hin starkes Zittern des Tieres, klonischen Krämpfen nicht unähnlich. Pupillen sehr eng, lichtstarr
		5^{00}	Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Rectaltemperatur 32,0° C. Atmung 8 p′. Es dauern: Exspiration + Apnoe 7″, die Apnoe allein 5″ (mit Stoppuhr gemessen)

		5^{45}	Atmung 12 p′. Von jetzt ab ziemlich ruhiger Schlaf, allmähliche Besserung. 3×24 Stdn. nach Beginn des Versuches ist das Tier wieder völlig munter, wenn auch etwas schwach; es frißt mit Appetit, begrüßt jeden, der es besucht, mit freudigem Gebell und Schweifwedeln
28. Hündin (Schäferhund-Bastard), 10,8 kg 3. III. 08 11^{10} 5,94 g Veronal, gelöst in 500 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,55 g V. pro 1 kg Tier	3. III.	11^{15}	Parese der Hinterbeine
		11^{20}	Parese auch der Vorderbeine. Tier taumelt erregt im Käfig umher
		11^{25}	Bauchlage. Salivation. Tier winselt, hustet, leckt sich die Nase. Atmung 20 p′
		12^{00}	Leichte klonische Krämpfe. Hier und da Spasmen der Beine. Pupillen eng, lichtstarr, tiefer Schlaf
		12^{30}	Atmung schnarchend, rasselnd, 8 p′. Tier liegt völlig schlaff da. Koma. Keine Schmerzleitung mehr
		1^{00}	Atmung 4 bis 6 p′, etwas irregulär, inäqual
		1^{30}	Pupillen werden weiter, sind lichtstarr
		2^{00}	Exitus letalis
29. Hündin, 7,0 kg 5. III. 08 5^{00} 3,5 g Veronal, gelöst in 350 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,5 g V. pro 1 kg Tier	5. III.	5^{05}	Leichte Parese d. Hinterbeine. Daher taumelnder Gang. Tier setzt sich schließlich nieder
		5^{12}	Bauchlage. Alle 4 Extremitäten paretisch. Starkes Geifern
		5^{17}	Tier ist sehr unruhig, schnauft, niest, winselt, leckt die Nase
		5^{20}	Seitenlage rechts
		5^{30}	Enorme Erregung des Tieres. Intensive Tret-, Kratz- und Schwimmbewegungen. Dabei deutliche Spasmen der Beine und der Nackenmuskulatur
		5^{35}	Jetzt starke Spasmen der Beine, wechselnd mit klonischen Krämpfen
		5^{45}	Stat. idem
			Die Vergiftung verläuft, abgesehen vom Tetanus, der hier fehlt, ganz analog Versuch 27, nur schneller. Dementsprechend sind die bei der Sektion gefundenen pathologisch-anatomischen Veränderungen besonders der Lungen weniger ausgedehnt als in Kontrollversuch Nr. 1 z. B.
	6. III.	früh	Tot gefunden
13. Ran. temporaria, 25 g 19. II. 08 1^{14} 0,006 g Ve-	19. II.	1^{30}	Springt nur noch auf starkes Kneifen. Sonst kriecht er nur noch
		1^{40}	Hält den Kopf nicht mehr, sondern läßt ihn auf die Unterlage sinken. Aus Rückenlage vermag er sich nur sehr mühsam in Bauchlage zu drehen

Fortsetzung der Tabelle von Seite 29.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in kg Datum, Zeit u. Anordnung des Versuches	Datum	Zeit	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung
13. (Fortsetzung) ronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,25 g V. pro 1 kg Frosch	1908 19. II.	2^{00}	Erträgt Rückenlage. Dreht sich nur noch auf starkes Kneifen um. Lungenatmung sistiert. Bisher keine deutliche Reflexsteigerung. Puls 26 p′
		2^{20}	Puls 22 p′. Bei Kneifen noch kräftige Abwehrbewegungen, wenn auch etwas unbeholfen, und noch immer Umdrehen in Bauchlage aus Rückenlage auf starkes Kneifen
		3^{45}	Puls 18 p′. Sonst Stat. idem
		4^{15}	Dreht sich spontan aus Rücken- in Bauchlage um. Wieder Lungenatmung. Extremitäten noch leicht paretisch. Erträgt nicht mehr Rückenlage
		5^{05}	Erträgt zeitweise wieder Rückenlage. Deutlicher Erschütterungsreflex
		7^{00}	„ „ „ „ Reflexe schwächer
	20. II.	früh	Erholt
14. Ran. temporar., 16 g 19. II. 08 4^{30} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,375 g V. pro 1 kg Frosch	19. II.	4^{40}	Kann sich nur noch schwer aus Rücken- in Bauchlage drehen. Kopf liegt auf der Unterlage. Extremitäten paretisch. Springt nicht mehr. Lungenatmung sistiert
		4^{45}	Rückenlage ertragen. Puls 28 p′
		5^{05}	Puls 24 p′
		5^{50}	Puls 22 p′
		6^{00}	Nach kräftigem Kneifen klonische Krämpfe angedeutet. Erschütterungsreflex erhöht. Stoß auf die Extremitätenknochen führt zu tetanischem Krampf der Muskeln der betr. Extremität. Starke Reflexerregbarkeit auf taktile Reize
	20. II.	früh	Erholt
15. Ran. esculent., 26 g 19. II. 08 6^{00} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,23 g V. pro 1 kg Frosch	19. II.	6^{30}	Leichte Parese der Beine
		6^{45}	Erträgt zeitweise Rückenlage. Reflexe erhöht. Parese der hinteren Extremitäten > die der vorderen
		7^{30}	Vermag noch, wenn auch mühsam, sich aus Rücken- in Bauchlage zu drehen
		7^{45}	Kann sich nicht mehr aus Rückenlage befreien

	20. II.	abds.	Erholt
19. Ran. esculent., 27 g 19. II. 08 6^{18} 0,012 g Veronal, gelöst in 2,0 ccm H_2O. Je 1 ccm in Bauch- u. 1 Seitenlymphsack = 0,44 g V. pro 1 kg Frosch	19. II.	6^{22}	Lungenatmung sistiert. Vorher sehr lebhaft, springt der Frosch jetzt nur noch auf starke Reize
		6^{25}	Rückenlage ertragen. Reflex nach Berührung der Sohlen gesteigert. Desgl. Erschütterungsreflex
		6^{35}	Zuckungen der Beine. Hinterbeine krampfhaft angezogen, Vorderbeine halb nach oben und vorn gestreckt. Puls 26 p′
	21. II.	abds.	Völlig erholt
20. Ran. esculent., 20 g, 60 Std. trocken gehalten, unter Glasglocke bei 20° C 22. II. 08 10^{55} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,3 g V. pro 1 kg Frosch	22. II.	11^{40}	Erträgt Rückenlage. Reflexe gesteigert
		12^{15}	Lungenatmung sistiert. Reflexe schwächer
		5^{10}	Wieder Erschütterungsreflex
	23. II.	früh	Noch Rückenlage. Reflexe gesteigert
	24. II.	früh	Erholt
30. Ran. esculent., 24 g. Vorbehandelt wie in Versuch Nr. 20 22. II. 08 10^{55} 0,012 g Veronal, gelöst in 2,0 ccm H_2O. Je 1 ccm Bauch- u. 1 Seitenlymphsack = 0,5 g V. pro 1 kg Frosch	22. II.	11^{25}	Erträgt Rückenlage. Starke Reflexsteigerung
		11^{40}	Nur noch für direkte taktile Reize empfängl. Lungenatmung sistiert. — 12^{15} Stat. idem
	23. II.	früh	Noch immer Rückenlage. Reflexe gesteigert, auch Erschütterungsreflex
	24. II.	10^{30}	Noch in Rückenlage. Doch vermag das Tier sich heute auf starke Reize in Bauchlage zu bringen. Ohne Reize jedoch Rückenlage weiter ertragen. Reflexe gesteigert
		12^{00}	Rückenlage spontan verlassen. Wird nicht mehr ertragen. Springt wieder auf Kneifen. Reflexe noch gesteigert
	25. II.	12^{00}	Völlig erholt

Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithineiweißmischungen.

Von

Hans Handovsky und Richard Wagner.

(Aus der physikalisch-chemischen Abteilung der biologischen Versuchsanstalt in Wien.)

(Eingegangen am 3. Januar 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

Angesichts der großen Bedeutung, die den lipoiden Substanzen in biologischer Hinsicht und besonders im Zellbestand als Angriffspunkten zahlreicher pharmakologisch wirksamer Substanzen zuzukommen scheint, galt es uns nicht als zwecklos, die Zustandsänderungen von Lecithinemulsionen mit jenen Mitteln der physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden anzugehen, die sich für die Untersuchung der Eiweißkörper an diesem Institut als überaus fruchtbar erwiesen haben, obwohl wir es da mit einem Material zu tun haben, das in seiner physikalisch-chemischen Homogenität hinter den Eiweißkörpern zurücksteht. Immerhin dürfte jede experimentelle Erweiterung des Tatsachenmateriales zur Erkennung und Beschreibung dieser wichtigen Körper willkommen sein.

Schon Porges und Neubauer[1]) haben in ihrer ersten Mitteilung über Lecithinemulsionen die fällende Wirkung von Säuren und Salzen auf die genannten Emulsionen eingehend studiert und dabei im wesentlichen die von Hofmeister und

[1]) Diese Zeitschr. 7, 152, 1907.

Pauli für das Eiweiß geltenden Ionenreihen auch für das Lecithin bestätigt gefunden. Wir versuchten nun auf Anregung von Herrn Professor Pauli, mittels der Bestimmung der Viscosität, deren Schwankung einen der feinsten Indicatoren im hydrophilen Verhalten von Emulsionskolloiden darstellt, die Zustandsänderungen des Lecithins näher kennen zu lernen.

Das Material, mit dem wir arbeiteten, war ein Gemisch von aus Eiern dargestellten Lecithinen, von Herrn Professor S. Fränkel uns in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt, das zu 95 bis 96% aus Trockensubstanz bestand; der Gesamtaschenrückstand, bezogen auf trockenes Lecithin, betrug 7,86%, wovon 3,17% auf Phosphatidphosphorsäure entfielen, so daß nach Abzug derselben von der Gesamtasche 4,69% eigentlicher Aschengehalt übrig blieben.[1]) Zu allen unseren Versuchen verwendeten wir als Ausgangslösung eine 1,5%ige wässerige Lecithinemulsion, die in der von Porges und Neubauer (l. c.) angegebenen Weise hergestellt wurde. 3 g Lecithin wurden gewogen, in möglichst wenig Äther vollkommen gelöst (vgl. unten) und dann mit 200 ccm Wasser ungefähr 1 Stunde kräftig geschüttelt. Darauf wurde etwa 48 Stunden CO_2-freie Luft im Dunkeln durchgeleitet, bis der ganze Äther vertrieben war. Die so hergestellten Emulsionen erwiesen sich für längere Zeit als vollkommen stabil, wie aus von Zeit zu Zeit zur Kontrolle ausgeführten Reibungsbestimmungen hervorging.

I.

Unsere ersten Versuche beziehen sich auf die innere Reibung von puren Lecithinemulsionen sowie von Laugen-, Säuren- und Salz-Lecithinen, worüber Tabelle I und II Aufschluß geben. In allen Versuchen erwies sich die Viscosität von Lecithinemulsionen als leicht bestimmbar und genau reproduzierbar.

Tabelle I.

Viscositätsbestimmungen an reinem, Laugen- und Salzlecithin. Versuchstemperatur war 37° C. Alle Reibungsbestimmungen in dieser Arbeit wurden mit dem Ostwaldschen Viscosimeter im Thermostaten bei konstanter Temperatur ausgeführt. Die angegebenen t-Werte sind die Durch-

[1]) Diese Analyse wurde im chem. Laboratorium der Spiegler-Stiftung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Fränkel ausgeführt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle den verbindlichsten Dank sagen.

strömungszeiten in 0,2 Sek. $t_{H_2O} = 385$. Die ursprüngliche Lec.-Em. war 1,5%. Lec.-Em. A.

Lecithinkonzentration %	Konzentration von NaOH	Konzentration des Salzes	t	1000 t/t_0
0,2	—	—	418	1086
0,5	—	—	467	1213
0,8	—	—	517	1351
0,5	0,0067 n	—	425	1104
0,5	0,0201 n	—	421	1094
0,5	0,0335 n	—	420	1091
0,2	0,0067 n	—	401	1042
0,8	0,0007 n		451	1172
0,5	—	0,0067 n NaCl	436	1130
0,5	—	0,0067 n Na_2SO_4	436	1130

Tabelle II.

Viscositätsbestimmungen an Laugen-, Säuren- und Salz-Lecithinemulsionen. 1,5% Lecithinemulsion mit den betreffenden Zusätzen halbverdünnt (0,75%); $t_0 = 385 \frac{sec}{5}$, Versuchstemperatur 37°; Laugen- und Salzversuche mit Lec.-Em. B. Säure mit Lec.-Em. C. In der Tabelle sind die Elektrolytkonzentrationen nach der Mischung angegeben.

Lecithin + Lauge			Lecithin + Salze			Lecithin + Säure		
	t	$t/t_0 \cdot 1000$		t	$t/t_0 \cdot 1000$		t	$t/t_0 \cdot 1000$
0,00 n-NaOH	446	1159	0,00 n-NaSCN	446	1159	0,00 n-CH_3COOH	493	1281
0,0001 n „	445	1156	0,001 n „	439	1140	0,01 n „	485	1260
0,001 n „	440	1143	0,01 n „	431	1120	0,02 n „	479	1244
0,01 n „	426	1107	0,01 n-NH_4SCN	431	1120	0,03 n „	487	1266
0,02 n „	425	1104				0,05 n „	492	1278
						0,01 n-HCl „	462	1200

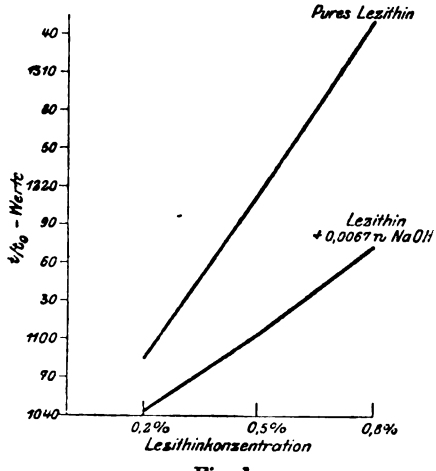


Fig. 1.

Aus den in Tabelle I registrierten Versuchen sehen wir vor allem, was auch Fig. 1 deutlich demonstriert, daß sich die Lecithinemulsionen in bezug auf ihre innere Reibung wie typische Emulsionskolloide verhalten; schon die Tatsache allein, daß die innere Reibung einer 0,75%igen reinen Lecithinemulsion eine beträchtliche Erhöhung gegenüber der von Wasser zeigt,[1])

[1]) Es ist bemerkenswert, daß sich die innere Reibung der wässerigen Lecithinemulsion

ferner vor allem, daß der Anstieg der Reibung mit steigender Lecithinkonzentration ein sehr steiler ist (Fig. 1), sprechen dafür, daß es sich bei unserem Lecithin um ein echtes Emulsionskolloid handelt, charakterisiert durch eine innige Beziehung zwischen Teilchen und Lösungsmittel. Aus diesen Versuchen (Tabelle I und II) geht aber außerdem auch hervor, daß alle Elektrolyte, Laugen, Säuren und Salze auf die innere Reibung des Lecithins im Sinne einer Viscositätsverminderung wirken.

Für die Einwirkung verschiedener Laugenkonzentrationen auf ein und dieselbe Lecithinkonzentration ergibt sich, daß die Erniedrigung der Lecithinreibung durch geringe Konzentrationen sowohl an Lauge als auch an Salz relativ am bedeutendsten ist und in höheren Konzentrationen des Elektrolyten nur in geringem Maße wächst. Die Kurve gewinnt dadurch eine auffallende Ähnlichkeit mit der bekannten Adsorptionsisotherme.

Bei Einwirkung ein und derselben Laugenkonzentration auf verschiedene Lecithinkonzentrationen ergeben sich interessante Verhältnisse. Wie aus Tabelle I hervorgeht, erniedrigt die 0,0067 n-NaOH die Viscosität des Lecithins in jeder untersuchten Konzentration um 50%. Es besteht in unserem Versuchsbereiche ein konstantes Verhältnis zwischen der inneren Reibung von reinem Lecithin und dem von mit Lauge versetzten Lecithin der gleichen Konzentration. So beträgt die Reibungserhöhung einer 0,2%igen Lecithinemulsion (gegenüber Wasser) 33, bei Zusatz der Lauge 16, bei einer 0,5%igen Emulsion sind die entsprechenden Werte 82 und 41, bei einer 0,8%igen 132 und 66.

Als Ursache dafür, daß die innere Reibung von Lecithinemulsionen sowohl durch Laugen, als auch durch Säuren und Salze erniedrigt wird, können wir vermuten, daß in der Emulsion in allen drei Fällen ein Entquellungsvorgang vor sich geht. In ihrer fällenden Wirkung hingegen zeigen Säuren, Laugen und Salze dem Lecithin gegenüber ein deutlich verschiedenes Verhalten.

Unsere Lecithinemulsionen erwiesen sich bei den Fällungsversuchen als etwas stabiler als die von Porges und Neubauer aus Handelslecithin hergestellten Emulsionen. Während Porges und Neubauer die Fällungsgrenze für NaCl schon bei $^n/_2$-Lösungen und für Ba-Salz bei 0,01 n-Lösungen fanden, trat an unseren Emulsionen die NaCl-Fällung selbst durch

---

um so niedriger einstellte, je weniger konzentriert die zur Herstellung der wässerigen Lecithinemulsionen verwendete ätherische Lecithinlösung war, je mehr Äther also zur Lösung derselben Lecithinmenge gebraucht worden war.

$^n/_1$-Lösungen noch nicht, die $Ba(NO_3)_2$-Fällung aber erst bei einer Konzentration von 0,05 n auf. Die erste Fällungszone, die Porges und Neubauer für die Salzsäure fanden, erwies sich bei genauerer Untersuchung als etwas breiter, und zwar reichte der fällende Konzentrationsbereich von 0,004 bis 0,01 n. Salze hemmen in Konzentrationen, in denen sie selbst nicht fällen, die fällende Wirkung der (0,004 n-) Salzsäure. Dafür sei als Beispiel Tabelle III angeführt.

Tabelle III.

1,5% Lecithinemulsion + 0,004 n-HCl + Salzlösung zu gleichen Teilen. Versuchsresultate nach 24h registriert.

Salzkonzentration	Resultat
0,00 n	±++
0,01 n-NaCl	—
0,02 n „	—
0,04 n „	—
0,001 n-$Ba(NO_3)_2$	—
0,002 n „	—
0,004 n „	—

Laugen hingegen bewirken keine Ausflockung des Lecithins, und Salzzusatz zum Laugenlecithin läßt die Emulsion unverändert. Über die fällende Wirkung von verschiedenen Salzen auf das reine Lecithin liegen bereits die notwendigen Versuche von Porges und Neubauer (l. c.) vor.

Die gute Verwendbarkeit der Reibungsmethode zur Erkenntnis feiner Veränderungen im Lecithin veranlaßte uns, auch einige narkotisch wirksame Substanzen in ihrem Einfluß auf die innere Reibung des Lecithins zu untersuchen. Eine orientierende Versuchsreihe mit den Stoffen Chloralhydrat, Bromalhydrat, Trional, Sulfonal und Äthylurethan zeigte, daß die Viscosität des reinen Lecithins nicht einsinnig und ganz unerheblich beeinflußt wird (vgl. die Tabellen IV und V). Nur der Alkohol macht eine Ausnahme, indem er die innere Reibung des Lecithins um ca. 2,5% erhöht;[1]) doch ist dieser Befund in Anbetracht des Umstandes, daß der Alkohol schon die Reibung von reinem Wasser ganz bedeutend erhöht, mit Reserve aufzunehmen, denn durch die Gegenwart des Lecithins wird das

[1]) Denn während z. B. ein 10%iger Alkohol eine um 28,7% höhere innere Reibung hat als Wasser, erhöht dieselbe Menge Alkohol eine 0,75%ige Lecithinemulsion um 31,2%.

zur Verfügung stehende Wasservolum verringert, der Alkohol mehr konzentriert und so die Reibung des Gemisches im Sinne einer weiteren Erhöhung verändert.

Tabelle IV.

1,5%ige Lecithinemulsion D halbverdünnt; $t_0 = 362 \frac{\text{sec.}}{5}$, Versuchstemp. 37°.

Narkoticum	Normalität des Narkoticums	Wässerige Nark.-Lösung		Nark.-Lec.-Mischung	
		t	t/t_0	t	t/t_0
—	—	362	1000	448	1238
2,5 ccm $^n/_{100}$-Chloralhydrat	0,0025	358	988	451	1246
2,5 „ $^n/_{100}$-Bromalhydrat	0,0025	360	994	448	1238
2,5 „ $^n/_{100}$-Trional . . .	0,0025	358	988	447	1235

Tabelle V.

Lecithinemulsion E; $t_0 = 366 \frac{\text{sec.}}{5}$, sonst wie Tabelle IV.

Narkoticum	Normalität des Narkoticums	Wässerige Nark.-Lösung		Nark.-Lec.-Mischung	
		t	t/t_0	t	t/t_0
—	—	366	1000	435	1189
2,5 ccm gesättigter Sulfonal	ca. 0,0025 n	366	1000	435	1189
2,5 „ $^n/_{100}$-Äthylurethan	0,0025 n	368	1006	436	1192
1 „ absol. Alkohol . .	1,5 n	471	1287	571	1560

II.

Um physiologischen Verhältnissen näher zu kommen, da ja das Lecithin im Organismus nicht als wässerige Emulsion vorkommt, versuchten wir, die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Lecithin-Eiweiß-Mischungen näher zu untersuchen. Vorausschicken möchten wir, daß schon vor längerer Zeit auf Anregung von Herrn Professor Pauli zahlreiche derartige Versuche mit aus Rinder- und Pferdeserum extrahierten Lipoiden im Institute angestellt worden waren. — Sowohl natives als auch dialysiertes Rinder- und Pferdeserum wurde im Schacherlapparat durch mindestens 24 Stunden mit Äther extrahiert. Nachdem der Äther vertrieben war, wurden die Lipoide im Wasser aufgenommen. Mit solchen ca. 0,2%igen Emulsionen wurden mehrere Versuchsreihen ausgeführt. Kurz zusammengefaßt waren die Resultate derselben etwa folgende:

Rinder- und Pferdeserumlipoide ergaben nach 24 Stunden sowohl mit nativem als auch mit dialysiertem, lipoidhaltigem und lipoidfreiem Rinder- und Pferdeserum deutliche Fällungen, die sich mit zunehmender Lipoidkonzentration verstärkten. Ebenso waren die Lipoidemulsionen imstande, in dem Serum, aus dem sie extrahiert worden waren, eine Flockung hervorzurufen. Kontrollversuche mit Wasser ergaben keine Fällungen (nur das globulinreichere Pferdeserum zeigte eine zarte Flockung). Eine Lösung von 0,1 n-NaCl war imstande, diese Serumlipoid-Serumfällungen zu hemmen; 0,1 n-$Ca(NO_3)_2$ konnte sie nicht vollständig hemmen, wahrscheinlich infolge der starken fällenden Wirkung der Salze der alkalischen Erden auf Lipoide. Bemerkenswert ist noch ein Versuch, bei dem wir die Lipoide nicht im Wasser aufnahmen, sondern direkt in dem Serum, aus dem sie gewonnen worden waren (0,0495 g Lipoide + 20 ccm dialysiertes Rinderserum); auch in diesem Fall zeigte sich eine deutliche Ausflockung, die von NaCl mehr oder minder gehemmt werden konnte.

Ebenso wie die Serumlipoidemulsionen rufen auch unsere 1,5%igen Lecithinemulsionen Fällungen unseres dialysierten Rinderserums hervor. Mehrere Gründe sprechen nun dafür, daß von Lecithin und ebenso von den Serumlipoiden im Rinderserum nicht das Albumin, sondern nur die Globuline gefällt werden. Zunächst ist die beobachtete Fällung nicht reichlich genug, als daß sie einer Gesamteiweißfällung entsprechen könnte, ferner macht es die hemmende Wirkung von Neutralsalzen auf die Fällung (für Lecithin s. u.) wahrscheinlich, daß es sich um Globuline handle, und endlich zeigt das in diesen Versuchen verwendete, extrem dialysierte Rinderserum noch immer bei Verdünnung mit Wasser zarteste Opalescenzen und nach längerem Stehen der Verdünnungen Änderungen in seiner elektrischen Leitfähigkeit. Um die Frage sicher zu entscheiden, welcher Eiweißkörper des Rinderserums an dieser Lecithinfällung beteiligt sei, machten wir den folgenden Versuch: Natives Rinderserum wurde mit Ammoniumsulfat halb gesättigt, nach 24stündigem Absitzen des Niederschlages wurde abfiltriert und das Filtrat bei Zimmertemperatur in einem geschlossenen Gefäß gegen destilliertes Wasser so lange dialysiert, bis im Außen-

wasser weder NH_4-Ion noch SO_4-Ion nachweisbar war. Die so gewonnene, wasserklare Albuminlösung versetzten wir mit Lecithin, wobei sich in keinem Falle eine Fällung ergab. Die folgenden Tabellen VI und VII illustrieren diesen Versuch.

Tabelle VI.

Je 5 ccm 1,5%ige Lecithinemulsion + Albuminlösung. Auf 10 ccm Gesamtvolum wurde mit destilliertem Wasser verdünnt.

Albuminlösung ccm	Resultat nach 48h
0	keine Fällung
1	„ „
2	„ „
3	„ „
4	„ „
5	„ „

Tabelle VII.

Je 5 ccm Albuminlösung + 1,5%ige Lecithinemulsion. Auf 10 ccm Gesamtvolum wurde mit destilliertem Wasser verdünnt.

Lecithinemulsion ccm	Resultat nach 48h
0	keine Fällung
1	„ „
2	„ „
3	„ „
4	„ „

Somit ist in hohem Grade wahrscheinlich gemacht, daß das Albumin an der Lecithin-Serumfällung nicht beteiligt ist, vielmehr die beobachtete Rinderserum-Lecithinfällung als eine Reaktion des Globulinrestes im Rinderserum aufzufassen ist.[1])

Über Einzelheiten in den Eigenschaften der Serum-Lecithinfällung und ihre Beeinflussung durch Elektrolyte orientieren die folgenden Versuche.

Diese wurden durchweg mit unseren 1,5%igen Lecithinemulsionen und dialysiertem elektrolytarmem Rinderserum angestellt. Das Rinderserum war 8 Wochen gegen fließendes, destilliertes Wasser, darunter 2 Wochen bei 30° dialysiert, vollständig klar, gerann bei 50° und hatte eine spezifische Leitfähigkeit von $k = 0{,}000\,030\,52$ (Stickstoffgehalt 0,3325%, Eiweißgehalt 2,0748%). Das Verhalten des Lecithins zum Rinderserum zeigte eine große Analogie zu dem der oben besprochenen Serumlipoide. Die im folgenden in den Lecithineiweißmischungen beobachteten Flockungen ließen deutlich zwei Typen erkennen. Die erste Form (K) wäre als Koagulation schlechthin zu bezeichnen mit Flocken am Boden des Gefäßes, die durch Schütteln nicht wieder in Lösung zu bringen waren. Die zweite (E) ist eine eigentümliche Form der Entmischung, bei der sich oben in einer Schicht über mehr oder weniger klarer Flüssigkeit

[1]) Diese Erfahrungen weisen auf einen Zusammenhang der zwei Phänomene am Luesserum hin, nämlich der Klausnerschen Beobachtung, daß destilliertes Wasser, in bestimmter Menge zu Luesserum zugesetzt, eine Globulinfällung erzeugt, und der bekannten Porgesschen Luesreaktion mit Lecithin und ähnlich wirkenden Substanzen.

Flocken ansammeln, die durch Schütteln wieder für einige Zeit in Verteilung gebracht werden können, aber bald wieder ausflocken. — Je gleiches Volum Emulsion und Rinderserum gibt eine deutliche Fällung vom Typus K; bei Lecithinüberschuß ist der Niederschlag stabiler als bei Serumüberschuß. Elektrolyte beeinflussen diese Fällung in ganz prägnanter Weise. Den Einfluß von Säuren kennzeichnet Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

(1,5%ige Lecithinemulsion A + Rinderserum) mit den entsprechenden Säuren zu gleichen Teilen gemischt. Die angeführten Konzentrationen der Säuren sind Endkonzentrationen nach der Mischung. ∅ bedeutet homogene Emulsion entsprechend der Ausgangslecithinemulsion. Beobachtung nach 24 Stunden.

a) 1,5 ccm Lec. + 3,5 ccm RS + 5 ccm Säure			b) 3,5 ccm Lec. + 1,5 ccm RS + 5 ccm Säure		
Säure	Konzentr.	Resultat	Säure	Konzentr.	Resultat
H_2O		+++K	H_2O		+++K
HCl	0,001 n	+++K	HCl	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	∅
	0,1 n	++E		0,1 n	++E
H_2SO_4	0,001 n	+++K	H_2SO_4	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	+++K
	0,1 n	++E		0,1 n	++E
$CCl_3.COOH$	0,001 n	+++K	$CCl_3.COOH$	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	+K
	0,1 n	+++K		0,1 n	++K
$CH_3.COOH$	0,001 n	++K	$CH_3.COOH$	0,001 n	+++K
	0,01 n	±		0,01 n	+K
	0,1 n	∅		0,1 n	++E

Die Säuren gehen also durch ein Lösungsmaximum; in 0,001 n Konzentrationen lassen sie den Niederschlag unverändert, in 0,01 n lösen sie ihn, in 0,1 n lassen sie ihn wieder im großen und ganzen unverändert; nur die schwache Essigsäure paßt sich nicht ganz diesem Schema an. Tabelle VIIIa illustriert diese Verhältnisse viel deutlicher als Tab. VIIIb, wo der stärkere Lecithingehalt das Lösungsmaximum verwischt. Laugen vermögen von einer bestimmten Alkalinität an den Lecithin-Rinderserumniederschlag wieder zu lösen; untersucht wurden Natronlauge, Ammoniak, Methylamin, Nikotin, Pyridin und Piperidin; 0,01 n-Piridin löst den Niederschlag noch nicht, die übrigen stärkeren Laugen in dieser Konzentration lösen bereits. Besonders bemerkenswert ist endlich der Einfluß der Salze auf den Lecithin-Rinderserumniederschlag (Tabelle IX). Im allgemeinen hemmen die Salze diese Fällung, und zwar ordnen sich die fällenden Ionen, der Ladung des Lecithins entsprechend vor allem die Kationen, zu einer bestimmten Reihenfolge: $NH_4 > Na >$

Ba = Mg. Die minder deutlich ausgesprochene Reihe der Anionen wäre: SCN > SO_4 > Cl.

Tabelle IX.

Alle Fällungen sind nach dem Typus E. Beobachtung nach 24 Stunden. (1,5%ige Lecithinemulsion + Rinderserum) mit den entsprechenden Salzen zu gleichen Teilen gemischt. Die angeführten Salzkonzentrationen sind Endkonzentration nach der Mischung. ∅ bedeutet homogene Emulsion entsprechend der Ausgangslecithinemulsion.

1,5 ccm Lec. + 3,5 ccm RS + 5 ccm Salz			3,5 ccm Lec. + 1,5 ccm RS + 5 ccm Salz		
Salz	Konzentr.	Resultat	Salz	Konzentr.	Resultat
H_2O		+++	H_2O		+++
NaCl	0,05 n	++	NaCl	0,05 n	+++
	0,5 n	+		0,5 n	+++
Na_2SO_4	0,05 n	+	Na_2SO_4	0,05 n	+++
	0,5 n	+		0,5 n	+++
NaSCN	0,05 n	±	NaSCN	0,05 n	+
	0,5 n	±		0,5 n	++
NH_4Cl	0,05 n	∅	NH_4Cl	0,05 n	∅
	0,5 n	∅		0,5 n	∅
$NH_4.SCN$	0,05 n	±	$NH_4.SCN$	0,05 n	∅
	0,5 n	±		0,5 n	+
$BaCl_2$	0,05 n	+++	$BaCl_2$	0,05 n	+++
$MgCl_2$	0,05 n	+++	$MgCl_2$	0,05 n	+++

Die folgenden Fällungsversuche dienten einer Orientierung über die Frage nach der Entstehung von Lecithin-Eiweißkomplexen. Die schon erwähnte Niederschlagsbildung von Lecithin mit salzarmem Rinderserum findet ihre einfachste Erklärung in der Annahme der Bildung von unlöslichen Lecithin-Globulinkomplexen, die durch Neutralsalzzusatz in Lösung gehalten werden können. Als diese Fällung hemmende Grenzkonzentration ergab sich (siehe Tab. X) für NH_4Cl 0,04 n, die, wie weitere Versuche zeigten (siehe Tab. XI), in weiten Grenzen von dem Verhältnis Lecithin-Rinderserum unabhängig ist.

Die übrigens quantitativ nicht leicht zu entscheidende Frage, ob es zur Bildung von Lecithin-Albuminkomplexen kommt, versuchten wir auf folgendem Wege zu beantworten. Es wurde zunächst die mit Sicherheit reines Lecithin in verschiedenen Verdünnungen fällende Bariumsalzkonzentration ermittelt.

Tabelle X.

1,5ccm 1,5%ige Lecithinemulsion + 3,5 ccm Rinderserum + 5 ccm NH_4Cl-Lösung. Fällungsresultat nach 24h.

Salzkonzentration	Resultat
0,00 n	+++
0,01 n	+++
0,02 n	+++
0,03 n	+++
0,04 n	–
0,05 n	–
0,1 n	–
0,3 n	–
0,5 n	–

Tabelle XI.

1,5%ige Lecithinemuls. + Rinderserum + 0,04 n-NH_4Cl. 10 ccm Gesamtvolum. Fällungsresultat nach 24h.

Lecithin ccm	RS ccm	Resultat
0,5	4,5	–
1,0	4,0	–
1,5	3,5	–
2,0	3,0	–
2,5	2,5	–
3,0	2,0	–
3,5	1,5	–
4,0	1,0	–
4,5	0,5	–

Es zeigte sich, daß von 0,05 n an alle Konzentrationen von $Ba(NO_3)_2$ Lecithin quantitativ fällen. Diese Fällung wird durch anwesendes Eiweiß und Alkalisalz (siehe Tab. XII) nicht gehindert. In einer folgenden Versuchsreihe (siehe Tab. XIII) wurden nun Lecithin und Rinderserum in einem Verhältnisse, das von 1:9 bis 9:1 variierte, mit globulinlösendem Alkalisalz (0,04 n-NH_4Cl) und der sicher fällenden 0,1 n-$Ba(NO_3)_2$-Lösung versetzt. Überall trat flockige Fällung auf. Von den entstandenen Niederschlägen wurde abfiltriert, die Filtrate halbverdünnt und mit konzentrierter HNO_3 unterschichtet. In allen Proben entstanden positive Eiweißreaktionen, wobei die Ringe bloß entsprechend dem variierenden Eiweißgehalt an Mächtigkeit sich unterschieden.

Tabelle XII.

1,5 ccm 1,5%ige Lecithinemulsion + 3,5 ccm Rinderserum + 5 ccm [0,04 n-NH_4Cl + $Ba(NO_3)_2$]. Fällungsresultat nach 24h.

Konzentration von $Ba(NO_3)_2$	Resultat
0,00 n	–
0,01 n	–
0,02 n	–
0,03 n	–
0,04 n	–
0,05 n	+++
0,075 n	+++
0,1 n	+++

Tabelle XIII.

1,5%ige Lecithinemulsion + Rinderserum + 0,04 n-NH_4Cl + 0,1 n-$Ba(NO_3)_2$. 10 ccm Gesamtvolum. Fällungsresultat nach 24h.

Lecithin ccm	RS ccm	Resultat
0,5	4,5	+++
1,0	4,0	+++
1,5	3,5	+++
2,0	3,0	+++
2,5	2,5	+++
3,0	2,0	+++
3,5	1,5	+++
4,0	1,0	+++
4,5	0,5	+++

Ein Anzeichen für eine Bildung von Lecithin-Albuminkomplexen selbst bei bedeutendem Überschuß des Lecithins (9:1) konnte nicht gefunden werden. Die von André Mayer[1]) beobachteten Lecithin-Eiweißkomplexe widersprechen unseren Beobachtungen nicht, da sie sich nur auf das Zusammenbringen von elektropositivem Albumin mit Lecithin beziehen. Wir müssen übrigens ausdrücklich hervorheben, daß unsere Versuche nicht gegen eine geringgradige Bindung von neutralem Albumin an das Lecithin sprechen, sondern nur gegen die Reaktion einer erheblicheren Eiweißmenge mit dem Lecithin unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen.

Endlich sei noch erwähnt, daß Salze imstande sind, den Niederschlag einer Säure-Lecithin-Rinderserummischung zu lösen, ebenso wie sie den Niederschlag aufhellen, den Säuren im reinen Lecithin hervorrufen:

Wir versetzten eine Mischung aus 2,5 ccm einer 1,5%igen Lecithinemulsion und 2,5 ccm einer ca. 2%igen RS-Lösung mit 5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, so daß die ganze Mischung einer 0,05 n-HCl entsprach; dabei wurde die Flüssigkeit unhomogen, aber der entstandene Niederschlag löste sich wieder, wenn wir 0,04 n-Na_2SO_4, NH_4SCN oder $Ba(NO_3)_2$ zufügten.

Schließlich seien noch Beispiele aus einer Anzahl von Versuchen erwähnt, die sich mit der Viscosität von Laugen-Lecithin-Rinderserummischung befassen mit entsprechender Variation aller drei Komponenten. Die graphischen Darstellungen in Fig. 1, 2 und 3 bieten einen guten Überblick über diese Versuche.

Kurz zusammengefaßt lautet das Ergebnis dieser Viscositätsbestimmungen folgendermaßen: mit steigendem Lecithingehalt wächst die innere Reibung von Laugeneiweiß; ebenso wächst die Viscosität von Laugenlecithin mit steigendem Eiweißgehalt und desgleichen die von Lecithineiweiß mit steigender Laugenkonzentration. Im ganzen und großen verrät, konform den obigen Fällungsversuchen (Tab. XIII), das Verhalten von Lecithineiweißmischungen keine Besonderheiten, die auf die Bildung von neuen Komplexen aus beiden Komponenten

[1]) André Mayer und E. F. Terroine, Untersuchungen über die kolloiden Komplexe der Albuminoide und Lipoide. I. Die Lecithalbumine sind kolloide Komplexe. Compt. rend. Soc. Biol. 62, 398, 1907

Tabelle XIV.

Lecithinemulsion A: $t_0 = 385$. Versuchstemperatur: 37° C.

Konz. des Lecithins %	Konz. des Rinder-serums %	Normalität der NaOH	t	t/t_0	Konz. des Lecithins %	Konz. des Rinder-serums %	Normalität der NaOH	t	t/t_0
A					F				
—	0,27	—	391	1016	—	0,27	0,0067	400	1039
—	0,66	—	401	1042	0,5	0,27	0,0067	439	1124
—	1,07	—	411	1068	G				
B					—	1,07	0,0067	422	1096
—	0,27	0,0067 n	400	1039	0,5	1,07	0,0067	462	1200
—	0,66	0,0067	411	1068	H				
—	1,07	0,0067	422	1096	0,5	—	0,0067	423	1099
C					0,5	0,27	0,0067	434	1124
0,2	—	—	421	1093	0,5	0,66	0,0067	446	1159
0,5	—	—	467	1213	0,5	1,07	0,0067	462	1200
0,8	—	—	520	1351	I				
D					0,2	—	0,0067	401	1042
0,2	—	0,0067	401	1042	0,2	0,66	0,0067	423	1098
0,5	—	0,0067	423	1099	K				
0,8	—	0,0067	451	1171	0,8	—	0,0067	451	1171
E					0,8	0,66	0,0067	485	1260
—	0,66	0,0067	411	1068	L				
0,2	0,66	0,0067	423	1098	0,2	0,66	0,0067	423	1098
0,5	0,66	0,0067	446	1159	0,2	0,66	0,0201	462	1200
0,8	0,66	0,0067	472	1226	M				
					0,5	0,27	0,0067	434	1124
					0,5	0,27	0,0201	454	1179

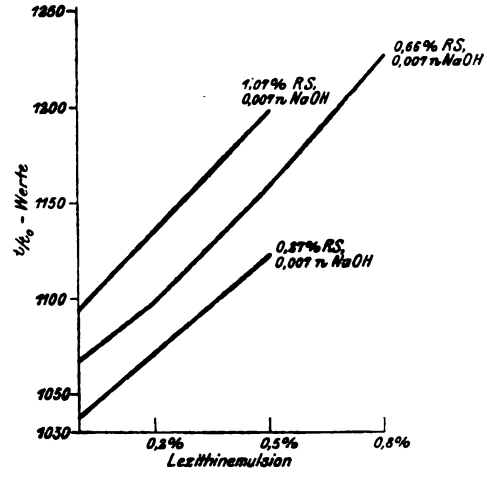


Fig. 2.

mit besonderen Eigenschaften schließen ließen, sondern beide, Lecithin und Eiweiß, wahren mehr oder weniger ihre Eigenschaften in der Mischung. Dafür dürften wir als Beleg vielleicht auch Berechnungen aus unseren Reibungsversuchen anführen, nach denen die aus der Summe des NaOH-Lecithins und Rinderserum berech-

neten Werte immer kleiner waren als die beobachteten, so daß wir annehmen können, daß die immer im Überschuß vorhandene NaOH sowohl vom Lecithin als auch vom Rinderserum gebunden wird.

In biochemischer Hinsicht scheint uns von Interesse, daß die Ionen der Elektrolyte mit ihrer Funktion, das Globulin im Solzustande zu erhalten (Pauli[1]), zugleich die Rolle verbinden, die Entstehung eines unlöslichen Lecithin-Globulinkomplexes in den tierischen Säften und wohl auch Geweben hintanzuhalten.

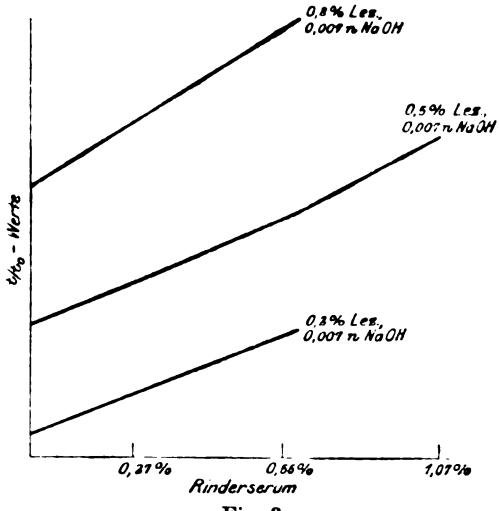


Fig. 3.

Schlußsätze.

1. Lecithinemulsionen zeigen eine bedeutende Reibungserhöhung gegen Wasser; diese wird durch Zusatz von Elektrolyten, sowohl Säuren, Basen als auch Salzen wieder herabgesetzt.

2. Die durch Salzsäure hervorgerufene Lecithinfällung kann durch Salze in Konzentrationen, die selbst nicht fällen, gehemmt werden.

3. Indifferente Narkotica lassen die Reibung von Lecithinemulsionen nahezu unverändert.

4. Das in einem sehr elektrolytarmen Serum eben noch in Lösung gehaltene Globulin wird durch Lecithin gefällt. Diese Fällung wird durch Neutralsalze gehemmt.

5. Dagegen lassen weder Fällungs- noch Viscositätsuntersuchungen eine Bildung von Kolloid-Komplexen aus Lecithin und neutralem Serumalbumin erkennen, wenn das Lecithin in Form einer Emulsion in Reaktion tritt.

---

[1]) Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweißkörper. Pflügers Archiv 78, 315, 1899.

Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch.

Von

J. Bauer und St. Engel.

(Aus der Akademischen Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 9. Januar 1911.)

Die totale Trennung der 3 Milcheiweißkörper: Casein, Albumin, Globulin ist bisher chemisch nur selten und biologisch noch niemals durchgeführt worden.

Seit Sebelien[1]) im Jahre 1885 mit Sicherheit festgestellt hat, daß neben dem Casein noch 2 Eiweißkörper, ein Albumin und ein Globulin in der Molke vorhanden sind, hat man wohl von dieser Tatsache allgemein Notiz genommen, sich aber sonst nur wenig mit diesen Körpern beschäftigt. Man hat vielmehr meist nur das Casein für sich und hiervon getrennt den Gesamtkomplex der Molkeneiweißkörper betrachtet.

Die neueren Handbücher der Biochemie (Oppenheimer) und der biochemischen Arbeitsmethoden (Abderhalden) legen hiervon Zeugnis ab. In wenigen Zeilen kann das Bekannte über das Lactalbumin und Lactoglobulin abgehandelt werden. Bei der Frauenmilch spez. ist überhaupt vom Albumin und Globulin noch nichts bekannt, nicht einmal ihr gegenseitiges Mengenverhältnis. Über diesen Punkt geben bei der Kuhmilch wenigstens einige Untersucher Daten an. Sie lehren, wie schon Sebelien erkannte, daß das Albumin reichlicher vorhanden ist als das Globulin. Vom Albumin ist weiter noch die elementare Zusammensetzung und die Krystallisierbarkeit geprüft worden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen[2]) wurden wir von mehreren Gesichtspunkten geleitet. Zunächst war uns daran gelegen, die chemischen Methoden der Trennung von

[1]) Sebelien, Beitr. z. Kenntn. d. Eiweißk. d. Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 445, 1885.

[2]) Ein Teil der Versuche wurde unter der Leitung der Verfasser von den Herren Philipp und Eufinger angestellt. Die bezügl. Dissertationen erscheinen demnächst.

Casein und Molke durch den biologischen Versuch auf ihre Vollständigkeit und Brauchbarkeit zu prüfen, und weiterhin wollten wir uns über die Verwandtschaft der einzelnen Eiweißkörper untereinander und mit denen des Blutes klar werden. Als notwendiges und natürliches Bindeglied haben wir unter diesem Gesichtspunkt auch das Colostrum und seine Proteine in den Kreis der Betrachtungen gezogen.

Chemische Trennung. Herstellung der Eiweißkörper.

Unsere erste Aufgabe mußte sein, die verschiedenen Eiweißkörper isoliert voneinander zu gewinnen. Wir bedienten uns hierbei folgender Methodik: Das Casein wurde, wie es Engel[1]) für die Frauenmilch und auf seine Veranlassung Friedheim[2]) für andere Milcharten ausgearbeitet hat, so abgetrennt, daß zur Milch in 5facher Verdünnung jene Menge $^n/_{10}$-Essigsäure zugefügt wurde, die eine komplette Fällung erzielt (ca. 60 bis 80 ccm auf 100 ccm Kuhmilch). Auf diese Weise erhielt man Casein und Molke. Das Casein wurde in der üblichen Weise weiter verarbeitet und als Pulver aufbewahrt. Die Molken wurden zur Gewinnung von Albumin und Globulin benutzt. Um hierbei nicht mit allzu großen Flüssigkeitsmengen operieren zu müssen (der Eiweißgehalt unverdünnter Molken beträgt bei Kuhmilch wie bei Frauenmilch je nur knapp 0,5%), haben wir uns öfters mit Vorteil solcher Milch bedient, die längere Zeit in gefrorenem Zustande aufbewahrt worden war. Nach dem Auftauen fällt ein Teil des Caseins spontan aus, der Rest läßt sich leichter, d. h. auch bei geringer Verdünnung mit Hilfe von Essigsäure abscheiden.

Das Verfahren gestaltete sich so, daß die gröbsten Caseinmengen zunächst durch ein Coliertuch zurückgehalten wurden. Es restierte eine grünlich-gelbliche trübe Flüssigkeit. Sie wurde mit dem halben Volumen $^n/_{10}$-Essigsäure versetzt und bis zum doppelten Volumen mit Wasser ergänzt. Das Casein schied sich in groben Flocken aus. Durch ein Faltenfilter erhielt man sofort ein klares, stark lichtbrechendes, grünliches Filtrat.

---

[1]) Engel, Eine einf. Meth. zur quant. Abscheidg. usw. Diese Zeitschr. 14, 234, 1908.

[2]) Friedheim, Über die Stickstoffvert. i. d. Kuh-, Büffel-, Ziegen-, Frauen- u. Eselsmilch usw. Diese Zeitschr. 19, 132, 1909.

Hieraus wurde nach vorangegangener Neutralisierung bis zur amphoteren Reaktion (gegen Lackmus) das Globulin mit $MgSO_4$ in Totalsättigung oder $(NH_4)_2SO_4$ in Halbsättigung ausgeschieden. Das nunmehr sich ergebende Filtrat war nicht mehr gefärbt, wohingegen das auf dem Filter sich sammelnde Gerinnsel öfters deutlich bräunlich tingiert war. Wir machen hierauf ausdrücklich aufmerksam, weil aus dieser Erfahrung hervorzugehen scheint, daß die Färbung des Milchserums durch das darin enthaltene Globulin bedingt ist.

Aus dem salzhaltigen Filtrat wurde das Albumin nach dem Vorgang von Sebelien durch Essigsäure gefällt. Es erwies sich hierbei — Vorversuche mit abgestuften Mengen — als zweckmäßig, für 100 ccm Filtrat 5 ccm 20%ige Essigsäure zu nehmen.

Die Globulinniederschläge wurden 3 mal umgefällt und teils dialysiert, teils, um das Ausfallen zu verhüten, in der letzten salzhaltigen Lösung benutzt. Das Albumin wurde weder der Umfällung noch Dialyse unterworfen.

Die geschilderte Darstellung der Proteine bezieht sich zunächst auf die Kuhmilch, doch wurde mutatis mutandis das gleiche Verfahren im Prinzip auch beim Colostrum und bei der Frauenmilch angewendet.

Albumin und Globulin wurden in Lösung aufbewahrt (eingefroren). Der Stickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl festgestellt.

Das Ausgangsmaterial bei Kuh- und Frauenmilch war Mischmilch, teils frische, teils längere Zeit im gefrorenen Zustande aufbewahrte Milch. Das benützte Colostrum war 1 Stunde nach dem Kalben von einer 6jährigen Kuh ermolken, war hellgelb, enthielt 5,25% Fett und 21,76% Eiweiß.

Sind wir nun berechtigt, die so gewonnenen Proteine als einheitliche Körper zu betrachten und sind wir auch berechtigt auszuschließen, daß etwa der eine Eiweißkörper durch den andern verunreinigt sei? Frühere Untersuchungen[1]) haben uns gelehrt, daß die Essigsäure offenbar nur schwer mit dem Casein Acidcasein bildet, ein Umstand, der daraus hervorgeht, daß die Caseinniederschläge auch dann nicht in Auflösung

[1]) Engel, Vergleichende Unters. ü. d. Verhalt. der Frauenmilch z. Säure u. Lab. Diese Zeitschr. 13, 89, 1908.

gehen, wenn man bei der Fällung die Säure überdosiert. Wir dürfen also annehmen, daß die klarfiltrierten Molken wirklich caseinfrei waren.

Diese Feststellung ist deswegen so wichtig, weil der aus der Molke durch Halbsättigung mit Ammonsulfat ausgeschiedene Körper sich ja besonders leicht mit Casein verunreinigen ließe, weil auch dieses durch die gleiche Konzentration gefällt wird. Aber selbst wenn in die erste Molkenfraktion noch Casein hineingekommen sein sollte, so wird es durch die wiederholte Umfällung eliminiert. Für die Zugehörigkeit des gewonnenen Körpers zu den Globulinen sprechen eine Anzahl von Eigenschaften, die ihm innewohnten:

1. Die Löslichkeit in 5 bis 10%igen Salzlösungen.
2. Die Fähigkeit der Hitzekoagulation.
3. Die Abscheidung eines schwerer löslichen Anteiles beim Dialysieren.
4. Der Umstand, daß der Körper seine Löslichkeit sehr leicht verlor.

Es ist somit der Schluß gestattet, daß der durch Halbsättigung aus der Molke gewonnene Körper den Charakter eines Globulins hatte.

Der durch Ganzsättigung gewonnene Molkeneiweißkörper charakterisierte sich als Albumin schon durch seine schwere Fällbarkeit und seine leichte Löslichkeit in Wasser.

Es muß also entgegen immer wieder auftauchenden Meinungen daran festgehalten werden, daß in der Milch tatsächlich Albumin und Globulin enthalten ist.

Biologische Trennung.

Lassen sich die Eiweißkörper der Milch, die wir chemisch isoliert haben, auch biologisch differenzieren? Mit anderen Worten: entsprechen den chemischen Individuen auch biologische?

Wenn wir uns diese Frage vorlegen, so müssen wir a priori daran zweifeln, wenn wir bedenken, daß wir ja sonst den Eiweißantigenen Arteigenheit vindizieren, d. h. also Unterschiede nur zwischen den Proteinen verschiedener Arten anerkennen. Die einzelnen Eiweißkörper der Milch gehören aber alle derselben Art an. Schon Bordet aber hatte der Milch durch seine glänzende Entdeckung eine Sonderstellung angewiesen, und Hamburger[1]), der als erster die Frage der Differenzierung der einzelnen Milcheiweißkörper anschnitt, hatte schon geglaubt, das Casein vom Albumin der Kuhmilch differenziert zu haben. Allerdings waren seine Resultate nicht eindeutig

[1]) Hamburger, Biologisches über die Eiweißkörper der Kuhmilch usw. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 49.

ausgefallen. Deshalb hat J. Bauer[1]) dieses Problem aufgenommen: Auch er fand, daß sich das Casein von den Eiweißkörpern der Molke biologisch trennen läßt.

Wie läßt sich diese Tatsache mit der Annahme der Arteigenheit vereinen?

Wir wissen, daß alle Arteigenheit nur eine relative ist. Das geht schon daraus hervor, daß das Antiserum gegen irgend ein Säugetiereiweiß bei gewisser Konzentration mit allen Säugetiereiweißen noch eine Reaktion gibt (mamalian reaction). Deshalb wird bekanntlich bei der Ausübung der forensischen Blutprobe nach Uhlenhuth-Wassermann verlangt, daß die betreffende zu untersuchende Blutflüssigkeit eine ungefähr bekannte Eiweißkonzentration von nicht unter 1:1000 besitzt.

Wir können demgemäß nicht erwarten, daß verschiedene Eiweißkörper derselben Tierart sich biologisch absolut trennen lassen. Das Problem liegt vielmehr so: lassen die einzelnen Eiweißkörper desselben Tieres oder noch spezieller desselben Gewebes trotz ihrer Artverwandtschaft noch Differenzen erkennen? Das ist in der Tat der Fall, wie für den speziellen Fall der Milch von Bauer gezeigt worden ist. Bauer[2]) und noch detallierter sein Mitarbeiter Kollmeyer[3]) konnten den Nachweis erbringen, daß sich die Caseine verschiedener Tierarten weitgehend sowohl von den Eiweißstoffen der Molke wie von denen des Blutserums derselben Art abtrennen lassen. Die Schärfe der Differenz ist sogar eine so große, daß bei nahe verwandten Tierklassen die Caseine der verschiedenen Arten (Ziege, Kuh, Büffel) sich weniger unterscheiden als das Casein und die Molken- bzw. Serumeiweißstoffe derselben Art. Die besondere biologische Stellung des Caseins, die aus den angeführten Tatsachen erhellt und die übrigens ein Analogon auch in gewissen biochemischen Besonderheiten dieses Körpers findet, ist so ausgesprochen, daß die Differenzierung von Milch und Serum selbst bei den Milcharten gelingt, die, wie z. B. die

---

[1]) J. Bauer, Zur Biologie der Milch. Verh. der Gesellsch. f. Kinderheilk., Salzburg 1909.

[2]) Bauer, Über den Artcharakter der Milcheiweißkörper. Berl. klin. Wochenschr. 1910, Nr. 18.

[3]) Kollmeyer, Über die biologische Differenzierung von Milch und Milcheiweißkörpern. Zeitschr. f. Biol. 54.

Frauenmilch neben dem Casein, auch prozentual genommen, beträchtliche Mengen an Albumin und Globulin enthalten. So sagt Bauer (l. c.): „Eine solche Trennung gelingt bis zu gewissem Grade zwischen Milch und Bluteserum eines Tieres zu erzielen. Wenn auch diese Differenzierung nicht immer vollständig zu erreichen ist, namentlich nicht bei den sogenannten Albuminmilchen, so ist sie doch quantitativ deutlich ausgesprochen und praktisch darstellbar." Damit findet ein Zweifel von Bauereisen[1]) seine Erledigung. Dieser Autor, dem wir eine eingehende Studie über die biologische Differenzierung der Milch- und Serumeiweißkörper des Menschen verdanken, hat mit Hilfe der Präcipitation ähnliche Befunde wie Bauer erhoben. Gleichwohl wundert er sich, daß Bauer die Trennung von Frauenmilch und Menschenserum gelungen ist. Er vermutet, daß dieser Trennung der hohe Gehalt an Molkenproteinen entgegenstehen müßte. Bauereisen berücksichtigt eben nicht die oben angeführte Sonderstellung des Caseins.

Ist es nun beim Casein — vermöge seiner biologischen Eigenstellung — methodisch relativ einfach, seine Abtrennung von anderen Eiweißkörpern derselben Art zu vollziehen, so müssen bei minder großen Dissonanzen die Versuchsbedingungen eben so gewählt werden, daß kleinere Differenzen auch zum Vorschein kommen können. Es empfiehlt sich daher hier von der Präcipitation Abstand zu nehmen und lieber die spezifischere Komplementbindung heranzuziehen, eine Methode, die natürlich auch beim Arbeiten mit Casein ihre großen Vorzüge hat. Selbstverständlich ist eine weitere Voraussetzung des Erfolges, daß man mit hochwertigen Antiseren arbeitet.

Unter Beobachtung der angeführten Kautelen haben wir die Beziehungen zwischen Casein, Albumin und Globulin bei der Milch und beim Colostrum und auch wechselseitig zwischen Milch- und Colostraleiweißkörpern geprüft.

Kuhmilch.

Die Tatsache, daß sich das Casein von dem Gesamtkomplex der Molkeneiweißkörper differenzieren läßt, steht, wie oben

[1]) Bauereisen, Die Beziehungen zwischen dem Eiweiß der Frauenmilch und dem Serumeiweiß von Mutter und Kind. Habilit.-Schrift, Marburg, 1910. Arch. f. Gynäk. 90.

gesagt, fest. Wie verhält sich nun das Casein zum Albumin und Globulin einzeln. Hierin, wie überhaupt in all die zu prüfenden Verhältnisse genauen Einblick zu gewinnen, war natürlich nur möglich, wenn man immer genau gleiche Mengen untereinander verglich. Die Konzentration der Eiweißlösungen wurde daher durch N-Bestimmung nach Kjeldahl festgestellt. Durch Verdünnung wurden dann sämtliche in einem Versuch verwendeten Flüssigkeiten auf die gleiche Stärke gebracht.

I. Verhältnis von Casein zu Albumin und Globulin. Ein Caseinantiserum reagiert naturgemäß bis zu einer hochgradigen Verdünnung mit Casein selber. Das entspricht früheren Feststellungen. Mit den Molkeneiweißkörpern hingegen erfolgt zwar auch eine Reaktion, jedoch erst bei ganz unverhältnismäßig stärkeren Konzentrationen. Dabei ergibt sich aber weiter ein bemerkenswerter Unterschied zwischen dem Albumin und Globulin. Das letztere zeigt nämlich noch in stärkerer Verdünnung mit dem Caseinantiserum Komplementbindung wie das Albumin. Rangiert man also die Milcheiweißkörper nach ihrer Verwandtschaft miteinander, so kommt erst das Casein, weit von ihm entfernt das Globulin und zuletzt, nicht wesentlich weiter ab, das Albumin. Näheres hierüber noch bei der Frauenmilch, s. S. 62.

Tabelle I.

Hämolyse

bei Einwirkung von 0,1 ccm Kuhmilch-Casein-Antiserum (50) auf 0,5%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen (je 1 ccm)	Kuhmilch-Casein	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Molke
1/4	0	0	0	0
1/8	0	0	0	0
1/16	0	0	fast 0	0
1/32	0	fast 0	mäßig	0
1/64	0	Spur	stark	Spur
1/128	0	wenig	komplett	mäßig
1/256	0	mäßig	„	fast komplett
1/512	mäßig	stark	„	komplett
1/1024	fast komplett	komplett	„	„
1/2048	komplett	„	„	„
0	„	„	„	„

II. Verhältnis von Albumin zu Globulin und umgekehrt. Hier war die Frage besonders interessant, ob sich

eine Differenzierung würde erzielen lassen. Ist es doch mit den bisherigen biologischen Methoden noch nicht sicher gelungen, Albumin und Globulin derselben Herkunft einwandfrei zu trennen, so daß die Meinungen über diese Möglichkeit durchaus noch nicht geklärt sind. Wir verweisen nur auf die diesbezüglichen Ausführungen von Uhlenhut und Weidanz in ihrem bekannten Buche.[1]) Die Ausschläge in unseren Versuchen, wo das Problem zum ersten Male mit Hilfe der Komplementbindungsmethode angegangen wurde, waren eindeutig. Die Antisera des Globulins reagierten in weit stärkeren Verdünnungen mit Globulin als mit Albumin und umgekehrt. Je nach der Wertigkeit der Antisera erhielten wir Unterschiede, die vom 10 bis 1000fachen schwanken.

Tabelle II.

Hämolyse

bei Einwirkung von Kuh-Colostrum-Albumin-Antiserum (93) 0,05 ccm auf 0,5%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Casein
1	0	0	wenig
1/2	0	0	mäßig
1/4	0	0	stark
1/8	0	0	fast komplett
1/16	0	mäßig	komplett
1/32	0	„	„
1/64	0	stark	„
1/128	mäßig	„	„
1/256	stark	komplett	„
1/512	komplett	„	„
1/1024	„	„	„

Für die Milch ist also hiermit bewiesen, daß alle drei konstituierenden Eiweißkörper sich biologisch deutlich differenzieren lassen. Anzunehmen ist, daß die von uns herangezogene Methodik auch auf die Proteine anderer Gewebselemente und Gewebsflüssigkeiten mit Erfolg anwendbar ist. Damit sind neue Differenzierungsmöglichkeiten für die Biologie gegeben, über deren wissenschaftliche und praktische Konsequenzen man erst später wird ein Urteil abgeben können. Jedoch sei hier wenigstens darauf hingewiesen, daß mit der Erkenntnis von der biologischen Trennbarkeit an sich art-

[1]) Uhlenhut und Weidanz, Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909.

gleicher Eiweißkörper die Möglichkeit in den Gesichtskreis tritt, daß ev. in einem Organismus durch von ihm selbst stammende Proteine Wirkungen ausgelöst werden könnten, wie sie ähnlich sonst nur durch artfremde Eiweißkörper erzeugt werden.

Tabelle III.

Hämolyse

bei Einwirkung von 0,05 ccm Kuhmilch-Globulin-Antiserum (162) auf 0,6%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1/2	0	0	0
1/4	0	0	fast 0
1/8	0	0	wenig
1/16	0	0	stark
1/32	0	0	fast komplett
1/64	0	mäßig	„ „
1/128	0	stark	„ „
1/256	0	„	komplett
1/512	0	„	„
1/1024	0	fast komplett	„
1/2048	0	komplett	„
1/4096	0	„	„
1/8192	0	„	„
1/16384	0	„	„
1/32768	mäßig	„	„
1/65536	komplett	„	„
0	„	„	„

Tabelle IV.

Hämolyse

bei Einwirkung von Kuh-Colostrum-Globulin-Antiserum (92) 0,03 ccm auf 0,04%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuh-Colostrum-Albumin	Kuh-Colostrum-Casein
1	0	0	0
1/2	0	0	Spur
1/4	0	0	mäßig
1/8	0	0	stark
1/16	0	wenig	komplett
1/32	0	stark	„
1/64	0	fast komplett	„
1/128	mäßig	komplett	„
1/256	stark	„	„
1/512	fast komplett	„	„
0	komplett	„	„

III. Verhältnis von Albumin und Globulin zu Casein. Die Antisera des Lactalbumins und des Lactoglobulins reagierten wechselseitig mit den zugehörigen Antigenen besser als mit dem Casein. Trotz der eben nachgewiesenen Trennbarkeit der beiden Molkenproteine erwies sich ihre Verwandtschaft untereinander doch größer als die mit dem Casein. Scheinbar paradoxerweise verhielten sich die Antisera des Albumins und Globulins in dieser Hinsicht ziemlich gleich, wiewohl man doch hätte vermuten sollen, daß das Globulinantiserum besser mit dem Casein reagieren würde wie das Albuminantiserum. (Hierzu s. Tab. II bis IV.)

IV. Schließlich wurde noch geprüft, wie die drei Milcheiweißkörper mit der Molke als Ganzes in Reaktion treten. Wie zu erwarten stand, verhielt sich das Casein relativ refraktär, während Albumin und Globulin noch in stärkeren Verdünnungen Komplementbindung gaben.

Auffällig war dabei, daß Molkenantiserum mit Globulin etwas weiter als mit Albumin reagierte, wiewohl man doch nach Maßgabe des quantitativen Vorkommens das Gegenteil hätte vermuten sollen.

Tabelle V.

Hämolyse

bei Einwirkung von 0,1 ccm Kuhmilch-Molken-Antiserum (161) auf 0,32%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Molke	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1	—	—	—	0
1/2	—	—	0	0
1/4	0	0	0	0
1/8	0	0	0	wenig
1/16	0	0	0	mäßig
1/32	0	0	0	stark
1/64	0	0	0	fast komplett
1/128	0	0	fast 0	komplett
1/256	0	0	„ 0	„
1/512	0	0	mäßig	„
1/1024	wenig	mäßig	stark	„
1/2048	stark	komplett	komplett	„
1/4096	komplett	„	„	„
0	„	„	„	„

Nimmt man hierzu noch, daß man durch die Injektion sehr schwacher Globulinlösungen dennoch sehr wirksame Anti-

sera erzeugen konnte, so gewinnt man den Eindruck, daß das Globulin ein besserer Antikörperbildner ist als das Albumin. Es stützt das die Annahme, daß auch das Serumglobulin der biologisch wirksamere Anteil des Serums ist. (L. Michaelis.)

Kommen wir nun zu einer der anfänglich aufgeworfenen Fragen, nämlich, ob die biologischen Methoden zur Kontrolle der chemischen Trennungsverfahren benutzt werden können, insbesondere zur Prüfung der Caseinfällung in der Milch, so ergibt sich, daß das wohl nur in beschränktem Umfange möglich ist. Caseinantiserum reagiert ja auch mit den reinen Molkenproteinen. Demgemäß wird es im gegebenen Falle ohne genaueste quantitative Auswertung bei der Prüfung einer Molke auf ihre Caseinfreiheit kaum möglich sein zu entscheiden, ob die Komplementablenkung nur auf die Molkenproteine oder auch noch auf Spuren von Casein zu beziehen ist, denn nur um Spuren kann es sich ja handeln.

Colostrum.

Für die Eiweißkörper des Colostrums gilt genau das gleiche wie für die der reifen Milch. Wir beschränken uns daher auf die Wiedergabe der entsprechenden Tabellen (s. o.).

Colostrum und Milch.

Für die Genese der Molkeneiweißkörper war es von der größten Wichtigkeit, sie mit denen des Colostrums zu vergleichen.

Die Colostrumeiweißkörper wurden auf folgende Weise dargestellt. Das Sekret wurde 5fach verdünnt und zu 300 ccm der Verdünnung 250 ccm Wasser und 50 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure zugefügt. Das Casein wurde abfiltriert und in der üblichen Weise weiter präpariert. Das Filtrat vom Casein war klar.

Aus der Molke wurde das Globulin durch Halbsättigung mit $AmSO_4$ abgeschieden. Der Niederschlag wurde in schnell laufender Zentrifuge abfiltriert. Nachdem die überstehende Flüssigkeit abgegossen war, wurde sofort mit Wasser zur Hälfte aufgefüllt. Das Sediment löste sich alsbald. Nun wurde mit $AmSO_4$ (gesättigte Lösung) das Zentrifugenglas gefällt und der entstehende Niederschlag wieder abzentrifugiert. Dieser Prozeß wurde noch 2mal wiederholt. Die letzte Lösung wurde benutzt.

Das Albumin wurde wieder aus einem Filtrate von mit $AmSO_4$ halbgesättigter Molke durch Essigsäure abgeschieden. (Siehe S. 48.)

Von dem Casein[1]) wird angenommen, daß es mit dem der Milch identisch sei, während vom Globulin Tiemann[2]) glaubte feststellen zu können, daß es von dem der Milch differiere. Allerdings sind diese Angaben niemals nachgeprüft worden. Unsere biologischen Versuche vermochten den ersten Befund zu erhärten, traten aber in Widerspruch zu dem zweiten. Wir mußten konstatieren, daß biologisch eine Differenzierung zwischen Milch- und Colostrumproteinen nicht möglich war (s. Tab. II bis III).

Wir wurden also zu dem Schluß gedrängt, daß zum mindesten biologisch Milch- und Colostrumeiweißkörper einheitlicher Natur sind.

Milch, Colostrum und Blutserum.

Die nächste Frage mußte nun die sein, wie stehen die Molkeneiweißkörper der Milch und des Colostrums zu denen des Blutserums, ihrer Quelle. Frühere Versuche von Bauer[3]) hatten schon die hohe Wahrscheinlichkeit gebracht, daß die Proteine der Molke und des Serums sich biologisch nicht mehr differenzieren lassen. Bauereisen hatte diesen Befund bestätigt. Wir gingen nunmehr dazu über, mit den isolierten Proteinen noch zu arbeiten und eine Stichprobe mit dem Globulin zu machen. Der Versuch ergab tatsächlich die biologische Identität der Globuline aus dem Serum, dem Colostrum und der Milch.

Tabelle VI.

Hämolyse

bei Einwirkung von Rinderserum-Globulin-Antiserum 0,1 ccm auf 0,19%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Rinderserum-Globulin	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuhmilch-Globulin
1/256	0	0	0
1/512	0	0	0
1/1024	mäßig	mäßig	mäßig
1/2048	fast komplett	fast komplett	stark
0	komplett	komplett	komplett

[1]) Sebelien, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 448, 1885.

[2]) Tiemann, ibid., 43, 282, 1898.

[3]) Bauer, Zur Biologie der Milch. Verhdl. d. Ges. f. Kinderh., Salzburg 1909.

Tabelle VII.

Hämolyse

bei Einwirkung von Rinderserum-Globulin-Antiserum 0,1 ccm auf 0,19%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1	0	0	fast 0
1/2	0	0	mäßig
1/4	0	0	„
1/8	0	0	stark
1/16	0	0	„
1/32	0	0	komplett
1/64	0	fast 0	„
1/128	0	stark	„
1/256	0	komplett	„
1/512	0	„	„
1/1024	fast 0	„	„
1/2048	wenig	„	„
0	komplett	„	„

Damit sind wir zu dem Ergebnis gelangt, daß die Milchdrüse zu allen Zeiten der Lactation Eiweißkörper produziert, die sich durch die zurzeit empfindlichsten Methoden nicht voneinander differenzieren lassen, von denen man also mit Fug und Recht annehmen muß, daß sie identisch sind. Man könnte ja wohl den Einwand erheben, und er muß sicherlich auch noch experimentell geprüft werden, daß auch die Komplementablenkungsmethode nicht genüge, um verschiedene Globuline oder Albumin derselben Art voneinander zu scheiden. Nachdem sich aber ergeben hat, daß Proteine verschiedener Arten trotz hochgradigster chemischer Ähnlichkeit biologisch scharf trennbar sind, daß weiter selbst chemisch so verwandte Körper wie Albumin und Globulin derselben Art durch Komplementbindung exakt zu differenzieren gehen, müssen wir wohl das Versagen dieser Methode in unserem Falle zugunsten der wirklichen Identität der geprüften Proteine verwenden dürfen.

Zur Theorie der Milch- bzw. Colostralsekretion.

Wenn wir an der Identität des Albumins und Globulins von Milch, Colostrum und Serum festhalten, so gewinnen wir für die Theorie der Milch- und Colostralsekretion gewisse neue Unterlagen. Zunächst müßte man folgern, daß es sich in beiden Fällen,

bei der Milch und bei dem Colostrum, um prinzipiell identische, wenn auch quantitativ verschiedene Prozesse handelt.

Um diese Tatsache verständlich zu finden muß man daran denken, daß die Milch ein Produkt sekretorischer und exkretorischer Drüsenfunktion ist, daß gewisse Bestandteile u. a. Molkenproteine, Harnstoff u. a. m. unverändert dem Blute entnommen und ausgeschieden werden.

Der Unterschied zwischen Milch- und Colostrumbildung würde dann darin liegen, daß in dem einen Falle mehr die sekretorische, in dem andern die exkretorische Komponente der Drüsentätigkeit im Vordergrunde steht. Es liegt nahe, den Grund hierfür wiederum darin zu suchen, daß sich in der Colostralzeit Prozesse in der Brustdrüse abspielen, die der Entzündung zum mindesten nicht fern stehen, eine Idee, die schon Bab[1]) auf Grund morphologischer Studien ausgesprochen hat. Die chemische Zusammensetzung des Colostrums spricht im gleichen Sinne.

Ganz abgesehen davon, daß entzündete Membranen erfahrungsgemäß für Eiweißkörper durchlässiger sind und daß sich also auf diese Weise der hohe Eiweißgehalt des Colostrums erklären ließe, können wir ja alltäglich eine Beobachtung machen, die für unsere Theorie geradezu die Dignität eines von der Natur angestellten Experimentum crucis hat. Wenn nämlich in der voll lactierenden Brustdrüse wirkliche Entzündungen auftreten, so wird ein Sekret geliefert, das morphologisch, chemisch und biologisch dem Colostrum überaus nahesteht.

Wir erinnern daran, daß als erstes Kennzeichen der Mastitis reichliche Zellbestandteile auftreten, in dem Maße, daß man dieses Phänomen der Diagnostik nutzbar gemacht hat (Tromsdorff). Hierzu steht in Parallele der Zellgehalt des Colostrums.

Wir weisen ferner darauf hin, daß der Proteingehalt der Mastitismilch weit höher ist als der der Milch, sich also auch dem des Colostrums nähert. Aber damit ist es noch nicht genug. Auch das Verhältnis der einzelnen Eiweißkörper untereinander entspricht bei der Mastitis nicht mehr dem Typus der Milch,

---

[1]) Bab, Die Colostrumbildung als physiolog. Analogon zu Entzündungsvorgängen. Berlin 1904.

sondern dem des Colostrums, d. h. nicht das Casein, sondern die Menge des Albumins und Globulins ist stark angewachsen, und zwar vor allen Dingen die des Globulins. So finden wir unter den Zahlen von Sassenhagen folgende Werte für Colostrum und die Milch von gesunden und kranken Kühen (Mastitis):

	Mastitis I	Mastitis II	Milch	Colostrum
Gesamteiweiß	5,475	4,785	—	—
Albumin + Globulin .	2,45	2,945	0,39	8,53
Albumin	0,12	0,53	0,27	0,65
Globulin	*2,33*	*2,415*	*0,12*	*7,9*

Die Tabelle zeigt instruktiv, eine wie große prinzipielle Ähnlichkeit hinsichtlich der Relation der Molkenproteine zwischen Mastitismilch und Colostralmilch herrscht.

Was die biologischen gemeinsamen Charaktere der beiden letztgenannten Milcharten anbelangt, so weisen wir auf die Befunde von Bauer[1]) und seinem Mitarbeiter Sassenhagen[2]) hin. Diese Autoren stellten fest, daß ein nennenswerter Gehalt an Haptinen zwar nicht in normaler Milch, aber doch im Sekret der Tiere zu finden sei, die entweder eine Euterentzündung hatten, oder in den ersten Tagen der Lactation sich befanden.

Wir glauben berechtigt zu sein, in den angeführten Verwandtschaftszeichen zwischen Mastitismilch und Colostrum eine besonders starke Stütze für die Anschauung zu finden, daß bei der Bildung des Colostrums sich Vorgänge abspielen, die der Entzündung nahestehen. Wir machen diese letztere Einschränkung ganz mit Absicht, da „Entzündung" zunächst ein

---

[1]) Bauer, Zur Biologie des Colostrums. Deutsche med. Wochenschr. 1909.

[2]) Bauer und Sassenhagen, Ein neues Verfahren zum Nachweis der Mastitismilch. Med. Klinik 1909, Nr. 51. — Sassenhagen, Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- und Mastitismilch. Inaug.-Dissertation. Arch. f. Kinderheilk. 1910.

klinischer und anatomischer Begriff ist und sich ein diesbezügliches Substrat in der puerperalen Brustdrüse nicht findet.

Frauenmilch.

Als wir daran gingen, die Molkeneiweißkörper der Frauenmilch zu studieren, mußte uns zunächst die Frage beschäftigen, was für Proteine überhaupt in dieser Milchart zu finden sind. Näheres hierüber ist noch nicht bekannt. Ein Unterschied gegen die Kuhmilch wurde seinerzeit von Wroblewski nur dahin aufgestellt, daß er in der Essigsäuremolke von Frauencasein einen Eiweißkörper in größeren Mengen annahm, der in der Kuhmilch nur in Spuren vorkäme und den er nach dem optischen Verhalten seiner Lösungen „Opalisin" nannte. Wir mußten demgemäß zuerst nachprüfen, ob etwa ein Körper vom Charakter des Opalisins neben dem zu mutmaßenden Albumin und Globulin vorhanden sei. Die bezüglichen Vorarbeiten, über die demnächst berichtet werden wird, wurden von Engel (mit Eufinger[1]) ausgeführt. Sie brachten das Resultat, daß wohl ein Globulin und ein Albumin in der Frauenmilchmolke vorhanden sei, daß aber ein drittes Protein sich durch fraktionierte Fällung nicht darstellen läßt. Weiterhin war es notwendig, auch über die Mengenverhältnisse des Albumins und Globulins eine Vorstellung zu gewinnen. Die hierauf gerichteten Versuche wurden von Engel[2]) vorgenommen. Sie brachten den interessanten Befund, daß das Verhältnis des Albumins zum Globulin umgekehrt ist wie in der Kuhmilch, daß nämlich mehr Globulin wie Albumin vorhanden ist.

Die Reindarstellung der Frauenmilchmolkenproteine vollzog sich genau so, wie es oben für Kuhmilch angegeben ist, d. h. es wurde erst das Casein mit der Essigsäuremethode Engels[3]) abgeschieden und dann das Globulin aus der neutralisierten Molke durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Auf die Darstellung des Albumins mußten wir leider verzichten, weil nur Spuren vorhanden waren.

---

[1]) Noch nicht publiziert.
[2]) Noch nicht publiziert.
[3]) Engel, l. c.

Verhältnis von Casein zu Globulin und umgekehrt.

Prüfte man Globulinantisera mit Casein und Globulin, so ergab sich eine sehr starke spezifische Reaktion mit Globulin, eine sehr geringe mit Casein. Ein sehr wesentlicher Unterschied gegenüber der Kuhmilch war nicht vorhanden. Wandte man die umgekehrte Versuchsanordnung an, d. h. stellte man Casein-Antisera gegen Casein und Globulin ein, so dokumentierte sich auch hier, wie schon früher bei der Kuhmilch, ein weit geringerer Unterschied. Es erfolgte nämlich nicht nur mit dem Casein, sondern auch mit dem Globulin eine weitgehende Komplementbindung, wenn auch mit dem letzteren längst nicht so stark wie mit dem ersteren. Da man das Entstehen von Verwandtschaftsreaktionen überhaupt durch die Multiplizität der Receptoren erklärt, so müssen wir annehmen, daß das Casein-Antiserum mehr Receptoren gegen Globulin enthält als das Globulin-Antiserum deren gegen Casein. Offenbar muß man sich den Vorgang so vorstellen, daß Casein und Globulin neben den für sie individuell charakteristischen Gruppen mit antigener Eigenschaft auch noch solche enthalten, die beiden gemeinsam sind, nur mit dem Unterschiede, daß das Casein daran eine größere Zahl wie das Globulin enthält. Diese Annahme würde zwanglos erklären, daß ein Casein-Antiserum relativ stärker wirksam sein muß gegen Globulin als ein Globulin-Antiserum gegen Casein.

Tabelle VIII.

Hämolyse

von 0,1 ccm Frauenmilch-Globulin-Antiserum (196) auf 0,15%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Frauenmilch-Globulin	Frauenmilch-Molke	Frauenmilch-Casein
1	0	0	0
$^1/_2$	0	0	fast 0
$^1/_4$	0	0	wenig
$^1/_8$	0	0	mäßig
$^1/_{16}$	0	fast 0	fast komplett
$^1/_{32}$	0	wenig	" "
$^1/_{64}$	0	mäßig	komplett
$^1/_{128}$	0	"	"
$^1/_{256}$	fast 0	stark	"
$^1/_{512}$	stark	fast komplett	"
$^1/_{1024}$	komplett	komplett	"
0	"	"	"

Tabelle IX.

Hämolyse

von 0,1 ccm Frauenmilch-Casein-Antiserum (169) auf 0,0025%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Frauenmilch-Casein	Frauenmilch-Globulin	Frauenmilch-Molke
1	0	0	0
$^1/_2$	0	0	0
$^1/_4$	0	0	0
$^1/_8$	0	mäßig	stark
$^1/_{16}$	0	fast komplett	fast komplett
$^1/_{32}$	0	komplett	komplett
$^1/_{64}$	wenig	„	„
$^1/_{128}$	„	„	„
$^1/_{256}$	mäßig	„	„
$^1/_{512}$	fast komplett	„	„
0	komplett	„	„

Auf die spezielle Prüfung des Albumins mußten wir aus den oben angeführten Gründen verzichten. Nachdem sich aber bisher in den gegenseitigen Beziehungen von Casein und Globulin analoge Resultate wie bei der Kuhmilch ergeben haben, liegt es nahe, auch für das Albumin der Frauenmilch das gleiche anzunehmen. Wir kommen daher zu folgenden Resultaten.

Schlußsätze.

I. Zur allgemeinen Eiweißbiologie.

1. Mittels der Komplementbindungsmethode läßt sich Albumin und Globulin derselben Art voneinander exakt trennen.

2. Das Globulin ist biologisch wirksamer als das Albumin, d. h. es bildet besser Antikörper.

II. Zur Biologie der Milcheiweißkörper.

1. Die drei Milcheiweißkörper Casein, Albumin und Globulin lassen sich biologisch differenzieren.

2. Das Globulin steht dem Casein näher als das Albumin.

3. Globulin und Albumin sind trotz ihrer Differenzierbarkeit untereinander näher verwandt als mit dem Casein.

4. Durch die, wenn auch entferntere Verwandtschaft des Caseins mit den Molkenproteinen ist die biologische Methode

nicht ohne weiteres fähig, die chemische Methode der Caseinfällung zu kontrollieren.

5. Die Colostrumeiweißkörper verhalten sich untereinander wie die der Milch.

6. Die Colostrumeiweißkörper lassen sich biologisch von denen der Milch nicht trennen.

7. Das gleiche gilt auch von den Proteinen des Blutserums gegenüber denen der Molke aus Milch oder Colostrum.

8. Globulin und Albumin aus Serum, Milch und Colostrum scheinen also identisch zu sein.

9. Die Eiweißkörper der Frauenmilch, soweit sie geprüft wurden, d. h. also Casein und Globulin, verhalten sich untereinander wie die der Kuhmilch.

Beiträge zur Kenntnis des Komplementes.[1])

Von

H. Braun.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. Januar 1911.)

Das früher von Ferrata[2]) im hiesigen Laboratorium geübte Verfahren der Trennung der Komplementbestandteile durch Dialyse war zunächst das natürlich gegebene, da es ja zur Aufklärung der Tatsache angewandt worden war, daß die Komplementwirkung im salzarmen Medium unterbleibt.

Während Brand[3]) und Hecker[4]) mit dieser Methode weiterhin brauchbare Resultate erzielten, machten wir, wie auch andere Autoren, bei unseren Versuchen die Erfahrung, daß sich die Bedingungen der Versuche nicht vollständig beherrschen lassen. Neben gelungenen Versuchsreihen tauchten Störungen aller Art auf. Bald erschien das Mittelstück sehr stark abgeschwächt, bald war die Trennung unvollständig, so daß das Endstück allein Komplementwirkung zeigte, bald traten in kürzester Zeit die von Brand und Hecker beschriebenen Modifikationen des Mittelstückes auf, durch deren Kenntnis diese beiden Forscher ein großes Hindernis im Fortschritt auf diesem Gebiet beseitigt haben. Wir bemühten uns vergebens, durch Änderung der Dialysiermembran (Schleicher und Schüll), durch Innehaltung bestimmter Temperaturen, durch Beachtung bestimmter Dialysenzeiten, durch verschiedenartige

[1]) Die Versuche sind auf Veranlassung von Prof. Morgenroth, unter Benutzung der diesem aus der Gräfin Luise Bose-Stiftung bewilligten Mittel ausgeführt.

[2]) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 13.

[3]) Brand, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34.

[4]) Hecker, Arbeiten a. d. Inst. f. experim. Ther. 1907, Heft 3.

Vorbehandlung des Meerschweinchenserums konstante Resultate zu erhalten.

Wie wenig die Methode der Dialyse hohen Anforderungen an Konstanz entspricht, ergibt sich aus einer kurzen Mitteilung von Ferrata und Carpani. Sie beobachteten — was wir allerdings niemals sahen —, daß nach langdauernder Dialyse die gesamte komplettierende Wirkung auf das Sediment, das sonst nur das Mittelstück enthält, übergegangen ist.

Sachs und Altmann[1]) versuchten zuerst mit Erfolg die Trennung zu erzielen, indem sie das Serum durch verdünnte Salzsäure fällten. Auch hier sind die Versuchsbedingungen, die innegehalten werden müssen, außerordentlich enge, und es erschien uns daher geraten, an ein schonenderes Verfahren anzuknüpfen, nämlich an die Ausfällung durch Einleitung von Kohlensäure, das zuerst von Liefmann[2]) verwendet worden ist.

Nach zahlreichen Vorversuchen erkannten wir als optimal folgende Bedingungen:

Das Serum wird im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, wobei eine leichte Trübung eintritt. Das zur Verdünnung dienende Wasser sowie das Waschwasser, das später zum Waschen des Niederschlages verwendet wird, ist auf 0° abgekühlt, um Abschwächungen nach Möglichkeit zu vermeiden.

Der Kohlensäureniederschlag bietet gegenüber dem bei der Dialyse erhaltenen den Vorteil der fast glatten Löslichkeit.

Eine Umwandlung des Mittelstückes in die Brandsche Modifikation findet bei einigermaßen raschem Arbeiten nicht statt, wie wir in zahlreichen vergleichenden Versuchen fest stellten.

Trotzdem gingen wir bei der Prüfung in der Regel so vor, daß wir zu den Blutkörperchen zuerst das Mittelstück und erst nach $^1/_4$ bis 1 Stunde das Endstück zusetzten.

Wie sich aus unseren Protokollen ergibt, muß man auch hier öfters mit einer Abschwächung der komplettierenden Wirkung beider Komponenten rechnen, etwa auf die Hälfte oder $^1/_3$ des ursprünglichen Wertes. Aber mit dieser Ein-

[1]) Sachs und Altmann, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforsch. Kraus-Levaditi, 2.

[2]) Liefmann, Berl. klin. Wochenschr. 1908.

schränkung gibt das Verfahren, das den großen Vorteil der Schnelligkeit hat, konstante Resultate.

Unser Verfahren gestaltet sich im Detail folgendermaßen:

Frisches Meerschweinchenserum wird im Glaskolben mit der zehnfachen Menge eiskalten destillierten Wassers gemischt und danach Kohlensäure aus einer Bombe eingeleitet. Die in einigen Augenblicken entstehende Trübung erreicht bald ihr Maximum, und durch sofort sich anschließendes kurzes Zentrifugieren erhält man eine Abtrennung des Niederschlages von der klaren Flüssigkeit. Beide Anteile werden nun gesondert behandelt. Die Flüssigkeit, deren Reaktion stets deutlich sauer ist, wird durch ein doppeltes gehärtetes Papierfilter filtriert, um jede Spur fester Teilchen zu vermeiden, die sich beim Abgießen vom Niederschlag beimengen konnten, und dann nochmals mit Kohlensäure behandelt, um der Vollständigkeit der Ausfällung sicher zu sein. Durch entsprechenden Zusatz von 10%iger Kochsalzlösung wird die Flüssigkeit auf den physiologischen Salzgehalt gebracht, öfters kräftig geschüttelt und in einem weiten offenen Gefäße im Eisschrank einige Zeit stehen gelassen, um die Kohlensäure zu vertreiben.

Der Niederschlag wird zunächst in einem vielfachen Multiplum eiskalten destillierten Wassers aufgeschwemmt und zentrifugiert. Diese Prozedur wird wiederholt, so daß also eine 2malige Waschung erfolgt. Bis zur Verwendung und endgültigen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung wird der Niederschlag auf Eis aufbewahrt. Zur Auflösung in Kochsalzlösung nehmen wir von derselben stets das Doppelte der Serummenge, welcher der Niederschlag entspricht, weil die Schnelligkeit der Lösung dadurch gefördert wird. Werden mit dieser so erhaltenen Mittelstücklösung Bindungsversuche ausgeführt, so wird dieselbe zuvor durch Papier klar filtriert.

Im Anschluß an die Beschreibung unserer Methodik möchten wir einige Bemerkungen hinzufügen über die von Brand und Hecker beschriebene Modifikation des Mittelstückes in Kochsalzlösung, die auch wir zu beobachten Gelegenheit hatten, und die wir uns gegebenen Falles absichtlich dann erzeugten, wenn das Mittelstück sensibilisiertes Blut auflöste, was bei der Kohlensäuremethode hie und da zu beobachten ist. Unter sonst gleichen Bedingungen gelingt einmal die Trennung des Komplementes vollständig, während andere Male, besonders bei hohem Amboceptorgehalt, das Mittelstück allein löst. Ist es aber einige Stunden in Kochsalzlösung aufbewahrt worden, dann verliert es diese Eigenschaft.

Wir müssen ausdrücklich betonen, daß wir uns bei unseren Versuchen äußerst selten dieser Modifiation des Mittelstückes bedienten und dann dies stets im Protokolle vermerkten.

Versuch 1.

(18. VI. 10.)

Am 15. VI. wurden 5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses wurde in 10,0 ccm Kochsalzlösung gelöst, und beide Komponenten sind auf Komplettierbarkeit untersucht worden.

Nachher wurden sie im Frigo bis zum 18. VI. aufbewahrt, um nochmals untersucht zu werden.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1 fach lös. Dos. $= 0{,}25^1/_{1000}$. Verwendet wurden $0{,}25^1/_{100} = 10$ fach lös. Dos.

Ziegenblut 5 %, 2 mal gewaschen.

Versuch am 18. VI.

I. II. Endstück und Mittelstück für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

III. Endstück + Mittelstück gleichzeitig:

1.	1,0 Endstück	+ 0,2	Mittelstück	(= 0,1	Ser.)	+ Amboc. + Blut	wenig
2.	0,5 „	+ 0,1	„	(= 0,05	„)		Spur
3.	0,3 „	+ $0{,}6^1/_{10}$	„	(= 0,03	„)		Spürchen
4.	0,2 „	+ $0{,}4^1/_{10}$	„	(= 0,02	„)		gelb
5.	0,1 „	+ $0{,}2^1/_{10}$	„	(= 0,01	„)		0, gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.						0, gelblich
7.	„ 2. „	„					0
8.	„ 3. „	„					0

IV. Endstück eine $^1/_2$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie III.

1.	1,0 Endstück	+ 0,2	Mittelstück	(= 0,1	Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ 0,1	„	(= 0,05	„)		„ „
3.	0,3 „	+ $0{,}6^1/_{10}$	„	(= 0,03	„)		kompl. Lös., Schleier
4.	0,2 „	+ $0{,}4^1/_{10}$	„	(= 0,02	„)		mäßig
5.	0,1 „	+ $0{,}2^1/_{10}$	„	(= 0,01	„)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.						gelblich
7.	„ 2 „	„					0
8.	„ 3. „	„					0

V. Endstück und Mittelstück sofort nach der Darstellung am 15. VI. untersucht. Endstück gleichzeitig mit dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie III.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. „ „ Schleier
4. mäßig
5. gelb
6. gelb, Kuppe
7. gelblich, Zone
8. 0

Resultat: Aus dieser Versuchsanordnung geht hervor, daß das Mittelstück, in Kochsalzlösung aufbewahrt, derart verändert wurde, daß es mit dem Endstück erst dann wirksam reagierte, wenn ihm Gelegenheit geboten wurde, mit dem sensibilisierten Blute eine kurze Zeit zuvor in Reaktion zu treten.

Versuch 2.
(15. VI.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Am vorhergehenden Tage (14. VI.) dargestelltes Endstück und in Kochsalzlösung aufgelöstes Mittelstück, die im Eiswasser aufbewahrt waren, wurden zum Versuch herangezogen. Es sind also vorhanden:

1. Endstück vom 14. VI. (Endstück alt),
2. Mittelstück „ 14. „ (Mittelstück alt),
3. Endstück „ 15. „ (Endstück frisch),
4. Mittelstück „ 15. „ (Mittelstück frisch).

I. II. Endstück (frisch) und Mittelstück (frisch) für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

III. IV. Endstück (alt) und Mittelstück (alt) für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

V. Endstück (frisch) gleichzeitig mit dem Mittelstück (frisch) + sensibiliertes Blut.

1.	1,0 Endstück + 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ + 0,1 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „ + 0,6 1/10 „	(= 0,03 „)		fast kompl. Lös.
4.	0,2 „ + 0,4 1/10 „	(= 0,02 „)		mäßig
5.	0,1 „ + 0,2 1/10 „	(= 0,01 „)		Spürchen
6.	wie 1. ohne Amboc.			Spur
7.	„ 2. „ „			„
8.	„ 3. „ „			Spürchen

VI. Endstück (alt) 1/4 Stunde nach Mittelstück (alt) zugesetzt. Versuchsanordnung dieselbe wie in V.

1. fast kompl. Lös.
2. wenig
3. Spur
4. gelblich
5. 0
6. 0, Zone
7. 0, „
8. 0, Zönchen

VII. Endstück (alt) 1/4 Stunde nach Mittelstück (frisch). Wie Reihe V.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. sehr stark
5. Spürchen
6. gelblich, Zönchen
7. 0
8. 0

VIII. Endstück (frisch) $^1/_4$ Stunde nach Mittelstück (alt) zugesetzt. Wie Reihe V.

1. fast kompl. Lös.
2. stark
3. Spur
4. gelblich
5. 0
6. gelblich, Kuppe
7. 0, Kuppe
8. 0, Zönchen

IX. Die Untersuchung des Endstücks (alt) und Mittelstücks (alt) am Tage ihrer Darstellung (14. VI.) ergab:

IXa. Endstück allein mit und ohne Amboceptor: Keine Hämolyse.

IXb. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor untersucht.

1. 0,5	Mittelstück	(= 0,25 Ser.)	mit Amboc.	fast kompl. Lös.
2. 0,25	„	(= 0,125 „)	„ „	wenig
3. 0,1	„	(= 0,05 „)	„ „	gelblich
4. wie 1.				gelblich
5. „ 2.	ohne Amboceptor			„
6. „ 3.				„

IXc. Endstück und Mittelstück gleichzeitig zugesetzt. Wie Reihe V.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. „ „ „
5. wenig
6. wenig
7. Spur
8. gelblich

Resultat. Das Endstück erfährt, wenn es längere Zeit in Kochsalzlösung aufbewahrt wird, keine Abschwächung. Das in Kochsalzlösung längere Zeit aufbewahrte Mittelstück erweist sich dagegen, wenn das Endstück kurz nach diesem zugesetzt wird, in seiner Wirkung vermindert.

Bei der von uns angewandten Methode, bei der wir das Mittelstück unmittelbar vor dem Versuche herstellten, konnten

wir eine Veränderung des Mittelstückes nicht nachweisen. Zahlreiche vergleichende Versuche, von denen wir einen unter Versuch 3 anführen, zeigten uns keine Differenz in der Hämolysewirkung nach dem zu verschiedener Zeit erfolgten Zusatze von Endstück. Nie sahen wir eine Verstärkung der Hämolyse, wenn das Endstück statt sofort erst nach 1 oder 2 Stunden zugesetzt wurde. Dagegen beobachteten wir einmal — und wir führen deshalb das betreffende Protokoll (Versuch 4) ausführlich an — eine deutliche Abschwächuug der Hämolyse nach 2 Stunden im Vergleich zu derjenigen nach sofortigem Endstückzusatz. Es liegt die Annahme nahe, daß während der angeführten Zeit eine Umwandlung des Mittelstückes stattgefunden hatte, diese muß aber anderer Art gewesen sein als die von Brand und Hecker beschriebene.

Versuch 3.
(12. VIII. 10.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück ist in 10,0 ccm Kochsalzlösung unmittelbar vor Anstellung des Versuches aufgelöst worden.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. $0{,}25^1/_{1000}$
Verwendet $0{,}25^1/_{100}$ = 10fach lös. Dos.

Endstück wurde zu verschiedenen Zeiten nach dem Mittelstück zugesetzt, und zwar

A. sofort
B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „
D. „ 2 Stunden

I. II. Endstück und Mittelstück mit und ohne Amboceptor geprüft, zeigen keine Hämolyse.

A. Endstück gleichzeitig zugesetzt.

1.	1,0 Endstück	+ 0,2 Mittelst.	(Endst.	+	Mittelst.	= 0,1 Ser.)	+ Blut + Amboc.	kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ 0,1 „	(„	+	„	= 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „	+ $0{,}6^1/_{10}$ „	(„	+	„	= 0,03 „)		sehr stark
4.	0,2 „	+ $0{,}4^1/_{10}$ „	(„	+	„	= 0,02 „)		Spur
5.	0,1 „	+ $0{,}2^1/_{10}$ „	(„	+	„	= 0,01 „)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.							gelblich
7.	„ 2. „	„						„
8.	„ 3. „	„						„

B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „ } wie A
D. „ 2 Stunden

Resultat: Keine Verstärkung der Hämolyse nach späterem Endstückzusatz.

Versuch 4.
(14. VI. 10.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Das letztere in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. $= 0{,}25\,^1/_{1000}$. Verwendet wurden $0{,}25\,^1/_{100} = 10$fach lös. Dos.

Das Endstück ist zu verschiedenen Zeiten nach dem Mittelstück zugesetzt worden, und zwar:

A. gleichzeitig
B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „
D. „ 2 Stunden

I. Endstück zeigt mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

II. Mittelstück auf Hämolyse geprüft.

1.	0,5 Mittelstück	(= 0,25 Ser.)	mit Amboc.	fast kompl. Lös.
2.	0,25 „	(= 0,125 „)	„ „	wenig
3.	0,1 „	(= 0,05 „)	„ „	gelblich
4.	wie 1.	ohne Amboc.		gelblich
5.	„ 2.	„	„	„
6.	„ 3.	„	„	„

A. Endstück gleichzeitig mit dem Mittelstück zugesetzt:

1.	1,0 Endstück + 0,2 Mittelst.	(Endst. + Mittelst.	= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ + 0,1 „	(„ + „	= 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „ + $0{,}6\,^1/_{10}$ „	(„ + „	= 0,03 „)		f. kompl. Lös.
4.	0,2 „ + $0{,}4\,^1/_{10}$ „	(„ + „	= 0,02 „)		„ „ „
5.	0,1 „ + $0{,}2\,^1/_{10}$ „	(„ + „	= 0,01 „)		wenig
6.	wie 1.	ohne Amboc.			wenig
7.	„ 2.	„	„		Spur
8.	„ 3.	„	„		gelblich

B. Endstück nach $^1/_2$ Stunde nach Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1.	kompl. Lös.
2.	„ „
3.	fast kompl. Lös.
4.	stark
5.	wenig
6.	wenig
7.	gelblich
8.	„

C. Endstück 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1. kompl. Lös.
2. fast kompl. Lös.
3. sehr stark
4. wenig
5. gelblich

6. gelb
7. gelblich
8. „

D. Endstück 2 Stunden nach dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1. kompl. Lös., Schleier
2. sehr stark
3. wenig
4. „
5. gelblich

6. gelblich
7. „
8. „

IV. Das native Meerschweinchenserum als Komplement.

1. $1{,}0\,^1/_{10}$ mit Amboc. kompl. Lös.
2. $0{,}5\,^1/_{10}$ „ „ „ „
3. $0{,}3\,^1/_{10}$ „ „ kompl. Lös., Schleier
4. $0{,}2\,^1/_{10}$ „ „ fast kompl. Lös.
5. $0{,}1\,^1/_{10}$ „ „ sehr stark

6. $1{,}0\,^1/_{10}$ ohne Amboc. Zone

Resultat: Während des 2stündigen Aufenthaltes im Brutschrank ist das Mittelstück alteriert worden.

Wir hatten diese Versuche zur Kontrolle ausgeführt, da für quantitatives Arbeiten eine unkontrollierbare Umwandlung eine große Fehlerquelle bedeuten würde. Doch spielt diese, wie die Versuche zeigen, bei unserer Methodik keine Rolle.

I.

Unser Bestreben war zunächst darauf gerichtet, die quantitativen Verhältnisse zwischen Mittelstück und Endstück im Meerschweinchenserum zu untersuchen, um dadurch eine Basis für die Beurteilung anderer Sera zu gewinnen.

Wir gingen davon aus, und fanden dies auch durch die Ergebnisse unserer Versuche bestätigt, daß die Auffassung, der

auch die unter Leitung Morgenroths entstandene Arbeit von Ferrata folgte, daß nämlich die bei der Trennung resultierenden Anteile sich im genuinen Serum wirklich als eine Einheit, das Komplement, darstellen, nicht frei von einem gewissen Vorurteil ist. Geht man ganz unbefangen an die Betrachtung heran, so kann man die Möglichkeit nicht von der Hand weisen, daß das „Komplement" als solches überhaupt nicht existiert und daß die Funktionen, die man bisher dem Komplement zuschrieb, gemeinschaftliche Funktionen des von Brand sogenannten Mittelstückes und Endstückes darstellen. Auch Liefmann und Cohn[1]) haben schon beiläufig die Vermutung ausgesprochen, daß im nativen Serum die beiden Komponenten getrennt nebeneinander vorhanden sind. Der Entwicklungsprozeß, der sich hier vollzieht, ist ganz analog demjenigen, dem nach Entdeckung der Amboceptoren der Buchnersche Begriff des Alexins unterlag. Auch danach mußten die cytolytischen Vorgänge, die zunächst auf der Wirkung einer einheitlichen Substanz zu beruhen schienen, auf zwei wesentlich verschiedene Substanzen zurückgeführt werden. Es ist jedenfalls bis auf weiteres günstiger für eine unbefangene Erforschung des Komplements, wenn man das Mittelstück und Endstück als von Anfang an getrennte und auch getrennt wirkende Faktoren ansieht. Um nicht eine unnötige Komplikation der Terminologie zu schaffen, behalten wir die Bezeichnung Mittelstück und Endstück bei, obwohl wir nicht glauben, daß für die Annahme der von Brand und Hecker vertretenen Anschauung über die Beziehungen zwischen beiden zwingende Gründe vorliegen.

Unsere Aufmerksamkeit war vor allem darauf gerichtet, zu untersuchen, ob normalerweise die beiden Komponenten stets in äquivalenten Verhältnissen vorkommen, oder ob die eine derselben isoliert oder wenigstens in bedeutendem relativem Überschuß zu finden ist. In unlösbarem Zusammenhang damit steht die gleichzeitig anzuschneidende Frage, ob Mittelstück resp. Endstück verschiedener Spezies sich gegenseitig vertreten können.

---

[1]) Liefmann und Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 6, Nr 1, 2/3; 7, Nr. 6; 8, Nr. 1.

Prinzipiell ist diese Frage von Landsteiner[1]), Liefmann und Guggenheimer[2])[3]) bejahend beantwortet worden, und auch wir finden das, soweit unsere Untersuchungen reichen, bestätigt. Unabhängig ist auch Marks[4]) zu analogen Ergebnissen gelangt. Diese Autoren haben aber keine quantitativ-vergleichenden Untersuchungen angestellt.

Man darf sich nicht verhehlen, daß die Grundlagen für quantitative Versuche keine besonders exakten sind.

Bringt man bei Meerschweinchenserum, nachdem man sich in der angegebenen Weise Lösungen von Mittelstück und Endstück gesondert hergestellt hat, die beiden Komponenten zusammen unter Anwendung von 5 Amboceptoreinheiten, so sieht man, daß die ursprüngliche Komplementwirkung nicht mehr erhalten ist. In III. der nachfolgenden Tabelle (Versuch 5) ist eine Einstellung des genuinen Meerschweinchenserums enthalten; 0,03 ccm führen zur kompletten Lösung.

Mischt man, wie es in IV geschieht, die beiden Anteile so, daß die Gemische bestimmten Mengen des ursprünglichen Serums entsprechen, so stimmt die komplettlösende Dosis mit 0,05 des Komplements überein. Die Reihen V und VI zeigen nun, daß bei einem Überschuß an Endstück (entsprechend 0,1 ccm ursprünglichen Serums) der zur vollständigen Hämolyse notwendige Bedarf an Mittelstück sinkt, nämlich auf eine Menge, die 0,025 Serum entspricht. Analog ist das Verhältnis bei der umgekehrten Versuchsanordnung in der Reihe VI. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die weiteren Versuche, in denen 20 bis 50 Amboceptoreinheiten in Anwendung kamen (Versuch 5 bis 8). Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch Liefmann und Cohn. Man darf wohl aus den Versuchen 5 bis 8, in denen sich Beziehungen zwischen den beiden Komponenten ergeben, die mit den von Morgenroth und Sachs beschriebenen quantitativen Beziehungen zwischen Amboceptor und Komplement Ähnlichkeit

[1]) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., Ref. Abt. I, 47.

[2]) Nachtrag zur Korrektur. Die interessanten Untersuchungen von Guggenheimer sind während der Drucklegung unserer Publikation erschienen und konnten daher nicht die gebührende Berücksichtigung finden. Das gleiche gilt von der Arbeit von Marks (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 4).

[3]) H. Guggenheimer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 3.

[4]) H. R. Marks, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 4.

haben, den Schluß ziehen, daß im Meerschweinchenserum Mittelstück und Endstück in einigermaßen äquivalentem Verhältnis vorhanden sind. Eine richtige Beleuchtung erhält diese funktionelle Messung erst durch die Verhältnisse, wie sie sich bei Sera anderer Tierspezies ergeben.

Versuch 5.
(21. IV. 10.)

4,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Mittelstück in 8,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. $0{,}5\,{}^1/_{1000}$. Verwendet wurden $0{,}25\,{}^1/_{100}$ = 5fach lös. Dos.

Das Endstück ist eine halbe Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt worden.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft:

1.	2,0 Endst.	(=0,2 Ser.)	+ 0,0 Kslg.	+ $0{,}25\,{}^1/_{100}$ Amb.	+ 1,0 Blut			sehr schwach gelbl. (Aggl.)
2.	1,0	„ (=0,1 „)	+ 1,0 „	+	„	+	„	do.
3.	2,0	„ (=0,2 „)	+ 0,25 „	+	0	+	„	gelblich
4.	1,0	„ (=0,1 „)	+ 1,25 „	+	0	+	„	„

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft:

1.	0,4 Mittelst.	(=0,2 Ser.)	+ 1,6 Kslg.	+ $0{,}25\,{}^1/_{100}$ Amb.	+ 1,0 Blut			Spur (Aggl.)
2.	0,2	„ (=0,1 „)	+ 1,8 „	+	„	+	„	gelbl. („)
3.	0,1	„ (=0,05 „)	+ 1,9 „	+	„	+	„	„ („)
4.	0,4	„	+ 1,85 „	+	0	+	„	0
5.	0,2	„	+ 2,05 „	+	0	+	„	0
6.	0,1	„	+ 2,15 „	+	0	+	„	0

III. Das native Meerschweinchenserum als Komplement:

1.	$1{,}0\,{}^1/_{10}$ Serum	+ 1,0 Kslg.	+ $0{,}25\,{}^1/_{100}$ Amboc.	+ 1,0 Blut			kompl. Lös.	
2.	$0{,}5\,{}^1/_{10}$ „	+ 1,5 „	+	„	+	„	„	
3.	$0{,}3\,{}^1/_{10}$ „	+ 1,7 „	+	„	+	„	„	Schleier
4.	$0{,}2\,{}^1/_{10}$ „	+ 1,8 „	+	„	+	„	sehr stark	
5.	$0{,}1\,{}^1/_{10}$ „	+ 1,9 „	+	„	+	„	wenig	
6.	$1{,}0\,{}^1/_{10}$ „	+ 1,25 „	+	0,0	+	„	Kuppe	
7.	—	+ 2,0 „	+ $0{,}25\,{}^1/_{100}$	Amboc.	+	„	0 (Agglutination)	
8.	—	+ 2,25 „	+	0,0	+	„	0	

IV. In der folgenden Versuchsreihe wurde das Endstück mit dem Mittelstück in Mengen zusammengetan, die den Komplementmengen in III. entsprechen.

Das Endstück wurde $^1/_2$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .	½ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2. 0,1 Mittelstück (= 0,05 Ser.) + 1,4 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„ „
3. 0,6 1/10 Mittelst. (= 0,03 Ser.) + 1,1 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,3 „ (= 0,03 „)	sehr stark
4. 0,4 1/10 Mittelst. (= 0,02 Ser.) + 1,4 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,2 „ (= 0,02 „)	stark
5. 0,2 1/10 Mittelst. (= 0,01 Ser.) + 1,7 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,1 „ (= 0,01 „)	Spur
6. wie 1. + 1,05 Kslg. + 0 + 1,0 Blut		+ 1,0 „	gelbl., Zone
7. „ 2. + 1,65 „ + 0 + „		+ 0,5 „	gelblich
8. „ 3. + 1,35 „ + 0 + „		+ 0,3 „	„

V. Konstante Mengen von Endstück und absteigende Quantitäten von Mittelstück.

1. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .	½ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2. 0,1 Mittelstück (= 0,05 Ser.) + 0,9 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	„ „
3. 0,05 Mittelst. (= 0,025 Ser.) + 0,95 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	„ „
4. 0,02 Mittelst. (= 0,01 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	sehr stark
5. 0,01 Mittelst. (= 0,005 Ser.) + 0,9 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	mäßig
6. wie 1. + 1,05 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut		+ „ „	Kuppe
7. „ 2. + 1,15 „ + 0 + „		+ „ „	„
8. „ 3. + 1,2 „ + 0 + „		+ „ „	Zone

VI. Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.

1. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .	½ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endst. (= 0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,3 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„
3. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,55 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,25 „ (= 0,025 „)	„ Schleier
4. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,7 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,1 „ (= 0,01 „)	sehr stark
5. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,75 Kslg. + 0,25 1/100 Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,05 „ (= 0,005 „)	mäßig
6. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,05 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 1,0 „	Zone
7. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,55 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „	gelblich
8. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,8 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 0,25 „	„

Resultat: Das Komplement ist durch die Spaltung auf ein Drittel der ursprünglichen Wirkung abgeschwächt.

Endstück und Mittelstück ersetzen sich gegenseitig bei der Hämolyse.

Versuch 6.

(20. VII. 10.)

Derselbe Versuch wie 5. Endstück und Mittelstück aus frischem Meerschweinchenserum dargestellt.

Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$. Verwendet wurde $0{,}1\,^1/_{100} = 20$fach lös. Dos.

I. und II. Endstück und Mittelstück zeigen mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1. $1{,}0\,^1/_{10}$ Ser.	+ Amboceptor + Blut		kompl. Lös.
2. $0{,}5\,^1/_{10}$ „			„ „
3. $0{,}3\,^1/_{10}$ „			„ „
4. $0{,}2\,^1/_{10}$ „		fast	„ „
5. $0{,}1\,^1/_{10}$ „			wenig
6. $1{,}0\,^1/_{10}$ ohne Amboc.			0
7. $0{,}1\,^1/_{10}$ Amboc.			0
8. Blut allein			0

IV. Endstück und Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. (Wie Vers. 5, IV.)

1. 0,2 Mittelstück	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut		kompl. Lös.
2. 0,1 „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)			„ „
3. $0{,}6\,^1/_{10}$ „	+ 0,3 „	(= 0,03 „)			„ „
4. $0{,}4\,^1/_{10}$ „	+ 0,2 „	(= 0,02 „)			stark
5. $0{,}2\,^1/_{10}$ „	+ 0,1 „	(= 0,01 „)			gelb
6. wie 1. ohne Amboc.					gelblich
7. „ 2. „	„				„
8. „ 3. „	„				∅

V. Konstante Mengen von Endstück und absteigende von Mittelstück. (Wie Vers. 5, V.)

1. 0,2 Mittelst. (= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endst. (0,1 Meerschw.-Ser.)	+ Amboc. + Blut		kompl. Lös.
2. 0,1 „ (= 0,05 „)	+ „			„ „
3. 0,05 „ (= 0,025 „)	+ „			„ „
4. 0,02 „ (= 0,01 „)	+ „			mäßig
5. 0,01 „ (= 0,005 „)	+ „			wenig
6. wie 1. ohne Amboc.				gelblich, Zone
7. „ 2. „	„			„ „
8. „ 3. „	„			„ „

VI. Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	„	+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	„	+ 0,25 „	(= 0,025 „)		fast „ „
4.	„	+ 0,1 „	(= 0,01 „)		wenig
5.	„	+ 0,05 „	(= 0,005 „)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.				gelblich
7.	„ 2. „ „				„
8.	„ 3. „ „				„

Resultat: I. Das gespaltene Komplement erscheint dem nativen gegenüber nur wenig abgeschwächt.

II. 1. $0{,}2\,^1/_{10}$ Mittelstück + 0,1 Endstück: keine Hämolyse (gelb)
2. $0{,}2\,^1/_{10}$ „ + 1,0 „ mäßige „
3. 0,2 ccm „ + 0,1 „ wenig „

Mittelstück und Endstück können sich also gegenseitig ersetzen. Insbesondere kann durch größere Endstückmengen die Lösung verstärkt werden.

Versuch 7.
(21. VI. 10.)

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Mittelstück in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Versuchanordnung wie im Versuch 5 mit der Ausnahme, daß das Endstück eine Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt wurde.

Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$. Verwendet wurde $0{,}1\,^1/_{100} = 20$fach lös. Dos.

Gesamtvolumen 3,1 ccm. Versuchsanordnung wie Versuch 5.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft:

1. 2,0 Endstück mit Amboc. gelblich, (Aggl.)
2. 1,0 „ „ „ „ „
3. 2,0 Endstück ohne Amboc. ∅
4. 1,0 „ „ „ ∅

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft.

1. 0,4 Mittelstück mit Amboc. Spur
2. 0,2 „ „ „ gelblich
3. 0,1 „ „ „ 0
4. 0,4 Mittelstück ohne Amboc. 0
5. 0,2 „ „ „ 0
6. 0,1 „ „ „ 0

III. Das native Meerschweinchenserum als Komplement. (Wie Vers. 5, III.)

1.	$1{,}0\,^1/_{10}$ Meerschweinchenserum	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	$0{,}5\,^1/_{10}$ „		„ „
3.	$0{,}3\,^1/_{10}$ „		„ „
4.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „		fast kompl. Lös.
5.	$0{,}1\,^1/_{10}$ „		mäßig
6.	$1{,}0\,^1/_{10}$		gelblich
7.	$-0{,}1\,^1/_{10}$ Amboc. allein		0, Aggl.
8.	— Blut allein		∅

IV. Endstück plus Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen.

Endstück eine Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1.	0,2 Mittelstück	+ 1,0	Endstück	(= 0,1	Kompl.)	mit Amboc. und Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „	+ 0,5	„	(= 0,05	„)		„ „
3.	$0{,}6\,^1/_{10}$ „	+ 0,3	„	(= 0,03	„)		sehr stark
4.	$0{,}4\,^1/_{10}$ „	+ 0,2	„	(= 0,02	„)		mäßig
5.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „	+ 0,1	„	(= 0,01	„)		gelblich
6.	wie 1.	+ 1,0	„			ohne Amboc.	gelblich, Kuppe
7.	„ 2.	+ 0,5	„				sehr schwach
8.	„ 3.	+ 0,3	„				gelbl., Zönchen
							sehr schw. gelbl.

V. Konstante Mengen von Endstück und absteigende Quantitäten von Mittelstück.

1.	0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endst.	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „	(= 0,05 „)	+ „			„ „
3.	0,05 „	(= 0,025 „)	+ „			„ „
4.	0,02 „	(= 0,01 „)	+ „			stark
5.	0,01 „	(= 0,005 „)	+ „			mäßig
6.	wie 1. ohne Amboc.					gelblich, Zone
7.	„ 2. „	„				„ „
8.	„ 3. „	„				gelblich, Zönchen

VI. Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.

1.	0,2 Mittelstück	(0,1 Ser.)	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	„		+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	„		+ 0,25 „	(= 0,025 „)		sehr stark
4.	„		+ 0,1 „	(= 0,01 „)		wenig
5.	„		+ 0,05 „	(= 0,005 „)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.					gelblich, Kuppe
7.	„ 2. „	„				gelblich
8.	„ 3. „	„				0

Resultat: I. Das gespaltene Komplement ist auf $^1/_3$ des ursprünglichen Wertes abgeschwächt.

1.	$0{,}2\,^1/_{10}$ Mittelstück	+ 0,1	Endstück:	keine Hämolyse
2.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „	+ 1,0	„	starke „
3.	0,2 ccm „	+ 0,1	„	wenig „

Versuch 8.

(21. VII. 10.)

Analoge Versuchsanordnung wie im Versuch 5.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegenblut-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. (1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$). Verwendet wurden $0{,}25\,^1/_{10} = 50$fach lös. Dos.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor:

1.	2,0 Endstück	(= 0,2 Ser.)	mit Amboc.	gelblich
2.	1,0 „	(= 0,1 „)	„ „	„
3.	2,0 „		ohne „	„
4.	1,0 „		„ „	„

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor:

1.	0,4 Mittelstück	(= 0,2 Ser.)	mit Amboc.	mäßig
2.	0,2 „	(= 0,1 „)	„ „	wenig
3.	0,1 „	(= 0,05 „)	„ „	gelblich
4.	wie 1. ohne Amboc.			0
5.	„ 2. „		„	0
6.	„ 3. „		„	0

III. Natives Meerschweinchenserum als Komplement:

1.	$1{,}0\,^1/_{10}$ Meerschweinchen	+ Amboc. + Blut		kompl. Lös.
2.	$0{,}5\,^1/_{10}$ „			„ „
3.	$0{,}3\,^1/_{10}$ „			„ „
4.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „			kompl. Lös., Schleier
5.	$0{,}1\,^1/_{10}$ „			mäßig
6.	$1{,}0\,^1/_{10}$ „	ohne Amboc.		sehr schw. gelblich
7.	Amboc. allein			0
8.	Blut „			0

IV. Endstück und Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in III entsprechen.

1.	0,2 Mittelstück + 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut		kompl. Lös.
2.	0,1 „ + 0,5 „	(= 0,05 „)			„ „
3.	$0{,}6\,^1/_{10}$ „ + 0,3 „	(= 0,03 „)			f. kompl. Lös.
4.	$0{,}4\,^1/_{10}$ „ + 0,2 „	(= 0,02 „)			stark
5.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „ + 0,1 „	(= 0,01 „)			Spürchen
6.	wie 1. ohne Amboceptor				sehr schwach gelblich
7.	„ 2.				0
8.	„ 3.				0

V. Endstück konstant, Mittelstück absteigend.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut		kompl. Lös.
2.	0,1 „ (= 0,05 „) + 1,0 „	(= 0,1 „)			„ „
3.	0,05 „ (= 0,025 „) + 1,0 „	(= 0,1 „)			kompl. Lös., Schleier
4.	0,02 „ (= 0,01 „) + 1,0 „	(= 0,1 „)			sehr stark
5.	0,01 „ (= 0,005 „) + 1,0 „	(= 0,1 „)			mäßig
6.	wie 1.				gelblich, Zone
7.	„ 2.				gelblich
8.	„ 3.				„

VI. Endstück absteigend, Mittelstück konstant:

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.)	+ 1,0	Endstück (= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,2 „	+ 0,5	„ (= 0,05 „)		„ „
3.	0,2 „	+ 0,25	„ (= 0,025 „)		„ „
4.	0,2 „	+ 0,1	„ (= 0,01 „)		mäßig
5.	0,2 „	+ 0,05	„ (= 0,005 „)		sehr wenig
6.	wie 1.				gelblich
7.	„ 2.				„
8.	„ 3.				0

Resultat: I. Gespaltenes Komplement stark abgeschwächt.

II. 1. $0{,}2\,^1/_{10}$ Mittelstück + 0,1 ccm Endstück: Spürchen Hämolyse
2. $0{,}2\,^1/_{10}$ „ + 1,0 „ „ sehr starke „
3. 0,2 ccm „ + 0,1 „ „ mäßige „

Endstück und Mittelstück können vikariierend für einander eintreten. Endstück vermag dies in höherem Grade als Mittelstück.

Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf Sera anderer Tierspezies erschien schon deshalb notwendig, weil sich die bisherigen Studien mit Ausnahme einiger kurz mitgeteilter Versuche von Liefmann, Landsteiner, Guggenheimer ausschließlich auf das Meerschweinchenserum beschränkt haben, das auch zweifellos besonders für die Begründung der Methodik das weitaus günstigste Objekt darstellt. Nachdem sich, wie aus den folgenden Versuchen ersichtlich ist, gezeigt hatte, daß Endstück und Mittelstück verschiedener Tierspezies (Meerschweinchen-Kaninchen) vikariierend für einander eintreten können, konnte man sich der Komponenten des Meerschweinchenserums bedienen, um mit Hilfe derselben die korrespondierenden Komponenten anderer Sera festzustellen. Hierzu war es nicht jedesmal notwendig, Mittelstück und Endstück der zu untersuchenden Sera isoliert darzustellen, sondern, wie weiterhin ersichtlich ist, genügte es, durch einfache Ergänzungsversuche das Vorhandensein der einen der beiden Komponenten zur Anschauung zu bringen.

Eine Ausnahme machten wir nur mit dem Kaninchenserum. Wir untersuchten dieses unter Verwendung des gewohnten Amboceptors, indem wir, wie beim Meerschweinchenserum, das Mittelstück durch Kohlensäurefällung, das Endstück aber, um die starke Verdünnung desselben zu vermeiden, nebstdem noch durch Dialyse gewannen. Wir lassen nun die Protokolle unserer beiden Versuche folgen.

Versuch 9.

(25. VI. 10.)

6,0 ccm frischen Kaninchenserums wurden im Fischblasenkondom 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert, filtriert und das Filtrat (= 8,0 ccm) mit 10%iger Kochsalzlösung isotonisch gemacht und als „Kaninchenendstück durch Dialyse gewonnen" verwendet.

5,0 ccm Kaninchenserum wurden mittels Kohlensäure in Mittelstück und Endstück gespalten.

Das Mittelstück wurde in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Gleichzeitig ist frisches Meerschweinchenserum (15,0 ccm) mittels Kohlensäure in Mittelstück und Endstück gespalten worden. Das Mittelstück wurde in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Das Endstück ist im folgenden Versuche $^1/_2$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt worden.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dös. $0{,}5\,^1/_{1000}$. In Anwendung kam $0{,}25\,^1/_{100} = 5$fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

I. Prüfung der Endstücke auf Hämolyse:

	Meerschweinchenendstück	Kan.-Endstück CO_2	Kan.-Endstück d. Dialyse
1. 2,0 Endstück + 0,0 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	gelbl.	gelbl.	gelbl.
2. 1,0 Endstück + 1,0 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	„	„	„
3. 2,0 Endstück + 0,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut .	„	„	„
4. 1,0 „ + 1,25 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„	„

II. Prüfung der Mittelstücke auf Hämolyse:

	Meerschweinchenmittelstück	Kaninchenmittelstück
1. 0,5 Mittelstück + 1,5 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	mäßig	gelblich
2. 0,25 Mittelstück + 1,75 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	Spur	„
3. 0,1 Mittelstück + 1,9 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	gelblich	„
4. 0,5 Mittelstück + 1,75 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut .	„	„
5. 0,25 „ + 2,0 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„
6. 0,1 „ + 2,15 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„

III. Prüfung der nativen

	Meerschweinchen	Kaninchen
1. 1,0 1/10 Serum + 1,0 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	kompl. Lös.	f. kompl. Lös.
2. 0,5 1/10 Serum + 1,5 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	„ „	gelblich
3. 0,3 1/10 Serum + 1,7 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	f. kompl. Lös.	„
4. 0,2 1/10 Serum + 1,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	sehr stark	„
5. 0,1 1/10 Serum + 1,9 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	wenig	„

IV. Endstück und Mittelstück derselben Spezies und in Kombination mit dem- Reihe III entsprechen.

1. 0,2	Mittelstück	(= 0,1	Komplement)	+ 0,8	Kslg.	+	0,25 1/100	Amboc.	+ 1,0	Blut		½ Stunde bei 37°
2. 0,1	„	(= 0,05	„)	+ 1,4	„	+	„	„	+ 1,0	„		
3. 0,6 1/10	„	(= 0,03	„)	+ 1,1	„	+	„	„	+ 1,0	„		
4. 0,4	„ „	(= 0,02	„)	+ 1,4	„	+	„	„	+ 1,0	„		
5. 0,2	„ „	(= 0,01	„)	+ 1,7	„	+	„	„	+ 1,0	„		
6. wie 1.				+ 1,05	„	+	0,0		+ 1,0	„		
7. „ 2.				+ 1,65	„	+	0,0		+ 1,0	„		
8. „ 3.				+ 1,35	„	+	0,0		+ 1,0	„		

Resultat: Das Endstück des Kaninchenserums ist durch die Spaltung unwirk- jenigen im Meerschweinchenserum. Da sich das genuine Kaninchenserum komplement-

Versuch 10.

(29. VI.)

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums und 7,0 ccm frischen Kaninchenserums wurden in angegebener Weise mittels Kohlensäure in Endstück und Mittelstück gespalten.

Sera auf Komplement:

	Meerschweinchen	Kaninchen
6. $1{,}0\,^1/_{10}$ Serum + 1,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	gelblich	wenig
7. $0{,}5\,^1/_{10}$ Serum + 1,75 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	—	gelblich
8. $0{,}3\,^1/_{10}$ Serum + 1,95 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	—	„
9. — + 2,0 Kslg. + $0{,}25\,^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	0	—
10. — + 2,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	0	—

jenigen der anderen Tierart, in Mengenverhältnissen, die den Komplementmengen in

	Meerschweinchenendstück + Meerschweinchenmittelstück	Kohlensäure-Kaninchenendstück + Kaninchenmittelstück	Kaninchenendstück durch Dialyse + Kaninchenmittelstück	Kaninchenendstück durch Dialyse + Meerschweinchenmittelstück	Meerschweinchenendstück + Kaninchenmittelstück
+ 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös.	Spürchen	gelblich	wenig	kompl. Lös.
+ 0,5 „ (= 0,05 „)	do., Schleier	gelblich	„	gelblich	do., Schleier
+ 0,3 „ (= 0,03 „)	stark	„	„	„	stark
+ 0,2 „ (= 0,02 „)	„	„	„	„	mäßig
+ 0,1 „ (= 0,01 „)	Spur	„	„	„	gelblich
+ 1,0 „ (= 0,1 „)	gelblich	„	„	„	sehr stark
+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„	„	„	„	Spur
+ 0,3 „ (= 0,03 „)	„	„	„	„	gelb

sam geworden. Der Gehalt an Mittelstück im Kaninchenserum entspricht etwa dem- ärmer zeigt, so kann dies nur in der Endstückmenge seinen Grund haben.

Das Meerschweinchenmittelstück wurde in 20,0 ccm, das Kaninchenmittelstück in 14,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Ambocceptor vom 10. V. 1fach lös. Dos. $0{,}25\,^1/_{100}$. Verwendet wurde $0{,}25\,^1/_{10} = 10$fach lös. Dos.

Das Endstück wurde $^1/_2$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

I. II. Die beiden Endstücke und Mittelstücke für sich allein auf Hämolyse geprüft, erwiesen sich als inaktiv.

Versuchsanordnung wie im Versuch 7, Reihe I und II.

III. Prüfung der nativen Sera auf Komplement.

	Meerschweinchenserum	Kaninchenserum
1. 1,0 1/10 Serum + 0,25 1/10 Amboc. + 1,0 Kslg. + 1,0 Blut	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2. 0,5 1/10 Serum + 0,25 1/10 Amboc. + 1,5 Kslg. + 1,0 Blut	„ „	mäßig
3. 0,3 1/10 Serum + 0,25 1/10 Amboc. + 1,7 Kslg. + 1,0 Blut	f. kompl. Lös.	Spur
4. 0,2 1/10 Serum + 0,25 1/10 Amboc. + 1,8 Kslg. + 1,0 Blut	sehr stark	∅
5. 0,1 1/10 Serum + 0,25 1/10 Amboc. + 1,9 Kslg. + 1,0 Blut	mäßig	∅
6. 1,0 1/10 Ser. + — + 1,25 Kslg. + 1,0 Blut	gelblich	mäßig
7. 0,5 „ „ + — + 1,75 „ + 1,0 „	—	0
8. 0,3 „ „ + — + 1,95 „ + 1,0 „	—	0
9. — + 0,25 1/10 Amboc. + 2,0 Kslg. + 1,0 Blut	∅	—
10. — + — + 2,25 Kslg. + 1,0 Blut . . .	∅	—

IV. Endstück und Mittelstück derselben Spezies und in Kombination mit dem- Reihe III entsprechen.

1.	0,2	Mittelstück	(= 0,1	Kompl.)	+ 0,8	Kslg.	+ 0,25 1/10	Amboc.	+ 1,0	Blut	½ Stunde bei 37°
2.	0,1	„	(= 0,05	„)	+ 1,4	„	+ „	„	+ 1,0	„	
3.	0,6 1/10	„	(= 0,03	„)	+ 1,1	„	+ „	„	+ 1,0	„	
4.	0,4	„ „	(= 0,02	„)	+ 1,4	„	+ „	„	+ 1,0	„	
5.	0,2	„ „	(= 0,01	„)	+ 1,7	„	+ „	„	+ 1,0	„	
6.	wie 1.				+ 1,05	„	+	0,0	+ 1,0	„	
7.	„ 2.				+ 1,65	„	+	0,0	+ 1,0	„	
8.	„ 3.				+ 1,35	„	+	0,0	+ 1,0	„	

Resultat: Das Endstück des Kaninchenserums ist durch die Spaltung abstück wie das Meerschweinchenserum.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß der Nachweis von Mittelstück und Endstück, wenn man die beiden Anteile des Kaninchenserums nach der Trennung wieder zusammenfügt, als mißlungen anzusehen wäre — ein gleiches Ergebnis, wie es Tsurusaki[1]) beim dialysierten Hunde- und Ziegenserum erhielt —, daß dagegen das Mittelstück, wenn man sich zur Ergänzung des Meerschweinchenserums als Endstück bedient, in ziemlich reichlicher Menge, etwa entsprechend dem Vorkommen im Meerschweinchenserum, nachweisbar ist. Man darf hieraus wohl den Schluß ziehen, daß das Endstück, das ja zweifellos im frischen Kaninchenserum vorhanden ist, bei den zur Trennung führenden Prozeduren eine Modifikation oder Abschwächung erfährt, durch die es dem Nachweis entzogen wird. Bekanntlich erscheint das Kaninchenserum bei allen Aktivierungsversuchen weit komplementärmer als das Meerschweinchenserum. Da nach unseren Versuchen der Gehalt der Kaninchensera am Mittelstück hinter dem des Meerschweinchenserums kaum zurücksteht, so darf man diese Erscheinung darauf zurückführen, daß im Kaninchenserum keine Äquivalenz zwischen Mittelstück und Endstück, sondern ein erheblicher Defekt des letzteren vorhanden ist.

jenigen der anderen Tierart in Mengenverhältnissen, die den Komplementmengen in

	Meerschweinchenendstück + Meerschweinchenmittelstück	Kaninchenendstück + Kaninchenmittelstück	Meerschweinchenendstück + Kaninchenmittelstück	Kaninchenendstück + Meerschweinchenmittelstück
+ 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös.	∅	kompl. Lös.	gelblich
+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„ „	∅	sehr stark	∅
+ 0,3 „ (= 0,03 „)	sehr stark	∅	stark	∅
+ 0,2 „ (= 0,02 „)	wenig	∅	wenig	∅
+ 0,1 „ (= 0,01 „)	schwach gelb	∅	gelblich	∅
+ wie 1.	Spur	∅	mäßig	gelblich
+ „ 2.	„	∅	wenig	∅
+ „ 3.	gelblich	∅	gelblich	∅

geschwächt. Das untersuchte Kaninchenserum enthält ungefähr genau soviel Mittel-

[1]) Tsurusaki, diese Zeitschr. 10, Heft 4 bis 6.

Man bestimmt also bei der üblichen Aktivierungsmethode im Falle des Kaninchenserums tatsächlich nicht den Gehalt desselben an Komplement, sondern den Gehalt an Endstück, ein Fehler, der den meisten bisherigen Bestimmungen dieser Art anhaften dürfte.

Zur Untersuchung der quantitativen Verhältnisse der Komplementbestandteile in anderen Normalseris bedienten wir uns der Sera von Ziege, Hammel, Rind, Hund und Mensch. Wir gingen dabei — wie schon oben erwähnt — so vor, daß wir das native Serum, ohne es zuvor zu spalten, mit dem sensibilisierten Blute einmal mit Meerschweinchenendstück, dann mit Meerschweinchenmittelstück zusammen digerierten.

Wir lassen nun ausführlich einige Protokolle unserer Versuche folgen. Zunächst diejenigen, die das Ziegen-, Hammel-, Rind- und Hundeserum betreffen.

Versuch 11.

(11. VIII. 10.)

Untersuchung der Sera von Ziege, Hammel, Rind und Hund auf ihren Gehalt an Mittelstück und Endstück.

Die Sera sind frisch. Sie wurden nativ dem sensibilisierten Blute zugesetzt und einmal mit Meerschweinchenendstück, das andere Mal mit Meerschweinchenmittelstück ergänzt, je nachdem, ob auf Endstück oder Mittelstück geprüft werden sollte. Um Vergleichswerte und die Bedingungen konstant zu erhalten, wurde dieselbe Methodik wie beim gespaltenen Meerschweinchenserum angewandt.

Wenn das native Serum auf Mittelstück geprüft werden sollte, so wurde es zunächst mit gleichem Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann in derselben Weise verfahren wie beim Meerschweinchenmittelstück, das wir ja gleichfalls in der doppelten Menge von Kochsalzlösung gelöst haben, als dem ursprünglichen Ausgangsvolum des Serums entsprach.

Bei der Prüfung auf Endstück wurde die Verdünnung 1:10 des Serums nach 1 Stunde dem sensibilisierten Blute + Meerschweinchenmittelstück zugesetzt.

Die Details sind aus den Versuchsprotokollen zu ersehen.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden mittels Kohlensäure gespalten. Das Mittelstück in 20,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenserum vom 11. VIII.

Hammelserum, Rinderserum, Hundeserum } vom 10. VIII.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. $= 0{,}5^1/_{1000}$. Im Versuch $0{,}5^1/_{100} = 10$fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

I. II. Meerschweinchenendstück und Meerschweinchenmittelstück, mit und ohne Amboceptor geprüft, zeigen keine Hämolyse. (Nur 0,5 ccm Mittelstück + Amboceptor: Spur.)

Versuchsanordnung wie Versuch 9, I und II.

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Versuch 9, III.

1. $1{,}0^1/_{10}$ kompl. Lös.
2. $0{,}5^1/_{10}$ „ „
3. $0{,}3^1/_{10}$ fast kompl.
4. $0{,}2^1/_{10}$ sehr stark
5. $0{,}1^1/_{10}$ Spur

6. $1{,}0^1/_{10}$ sehr schwach gelblich
7. Amboc. allein: ∅, Agglutination[1])
8. Blut allein: ∅

IV. Meerschweinchenendstück mit Meerschweinchenmittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen.

1.	0,2 Mittelstück (=0,1 Kompl.) + 0,8 Kslg. + $0{,}5^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+1,0 Endst. (=0,1 Kompl.) kompl. Lös.
2.	0,1 Mittelst. (= 0,05 Kompl.) + 1,4 Kslg. + $0{,}5^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+0,5 „ (=0,05 „) „ „
3.	$0{,}6^1/_{10}$ Mittelst. (=0,03 Kompl.) + 1,1 Kslg. + $0{,}5^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+0,3 „ (=0,03 „) sehr stark
4.	$0{,}4^1/_{10}$ Mittelst. (=0,02 Kompl.) + 1,4 Kslg. + $0{,}5^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+0,2 „ (=0,02 „) wenig
5.	$0{,}2^1/_{10}$ Mittelst. (=0,01 Kompl.) + 1,7 Kslg. + $0.5^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+0,1 „ (=0,01 „) sehr schwach gelblich
6.	wie 1. + 1,30 Kslg. + — + 1,0 Blut		+ 1,0 „ gelb
7.	„ 2. + 1,9 „ + — + 1,0 „		+ 0,5 „ 0
8.	„ 3. + 1,60 „ + — + 1,0 „		+ 0,3 „ 0

[1]) Diese ist selbstverständlich in allen Proben mit Amboceptor eingetreten. Vermerkt wurde sie in diesen Protokollen nur dort, wo sie besonders intensiv war.

V. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum auf Hämolyse Verdünnung 1:10 untersucht.

1.	1,0 konz. Serum	(Hundeserum $^1/_{10}$)	+ 1,5	Kochsalzlösung	+ 1,0	Blut	. . . . .
2.	0,5	do.	+ 2,0	„	+ 1,0	„	. . . . .
3.	0,25	do.	+ 2,25	„	+ 1,0	„	. . . . .
4.	0,1	do.	+ 2,4	„	+ 1,0	„	. . . . .
5.	0,05	do.	+ 2,45	„	+ 1,0	„	. . . . .

VI. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mit Amboceptor in der Verdünnung 1:10.

1.	1,0 konz. Serum	(Hundeserum $^1/_{10}$)	+ 1,0	Kochsalzlös.	+ 0,5 $^1/_{10}$	Amboc.	+ 1,0	Blut
2.	0,5	do.	+ 1,5	„	+ 0,5 $^1/_{10}$	„	+ 1,0	„
3.	0,25	do.	+ 1,75	„	+ 0,5 $^1/_{10}$	„	+ 1,0	„
4.	0,1	do.	+ 1,9	„	+ 0,5 $^1/_{10}$	„	+ 1,0	„
5.	0,05	do.	+ 1,95	„	+ 0,5 $^1/_{10}$	„	+ 1,0	„

VII. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mit Meer- und Mittelstück tritt hierbei Hämolyse auf.

1.	1,0 konz. Serum	(Hundes. 1:10)	+ 1,5	Kslg.	+ 1,0	Blut	1 St. bei 37°	+ 1,0	Meerschw.-Endstück
2.	0,5	do.	+ 2,0	„	+ 1,0	„		+ 1,0	„
3.	0,25	do.	+ 2,25	„	+ 1,0	„		+ 1,0	„ (= 0,1 Kompl.)
4.	0,1	do.	+ 2,4	„	+ 1,0	„		+ 1,0	„
5.	0,05	do.	+ 2,45	„	+ 1,0	„		+ 1,0	„

VIII. Untersuchung des Rinderserums, Hammelserums, Ziegenserums und Hunde-

1.	0,2	Serumverdünnung	1:12 (= 0,1 Ser.)	+ 0,8	Kslg.	+ 0,5 $^1/_{100}$	Amboc.	+ 1,0	Blut	1 Stunde bei 37°
2.	0,1	„	1:12 (= 0,05 „)	+ 1,4	„	+ „	„	+	„	
3.	0,6	Serumverdünnung	1:20 (= 0,03 „)	+ 1,1	„	+ „	„	+	„	
4.	0,4	„	1:20 (= 0,02 „)	+ 1,4	„	+ „	„	+	„	
5.	0,2	„	1:20 (= 0,01 „)	+ 1,7	„	+ „	„	+	„	
6.	wie 1.			+ 1,30	„	+	0	+	„	
7.	„ 2.			+ 1,9	„	+	0	+	„	
8.	„ 3.			+ 1,60	„	+	0	+	„	

geprüft. Die ersteren 3 wurden in konzentriertem Zustande, das Hundeserum in der

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
Spur, starke Aggl.	gelblich	gelblich	fast kompl. Lös.
gelblich, starke Aggl.	sehr schwach gelb	0	gelb
„ „ „	0	0	sehr schwach gelblich
sehr schwach gelblich	0	0	0
∅	0	0	0

auf Hämolyse geprüft. Die ersten 3 in konzentriertem Zustande, das Hundeserum

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
wenig, Aggl.	Spur, Aggl.	wenig, Aggl.	kompl. Lös.
gelblich, Aggl.	gelblich, Aggl.	„ „	mäßig
„ „	0, Aggl.	Spur, „	gelblich
„ „	0, „	∅, Aggl.	sehr schwach gelblich
schwach gelblich, Aggl.	0, „	∅, „	∅

schweinchenendstück zusammen untersucht. Bei Anwesenheit von Normalamboceptoren

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
wenig, Aggl.	gelblich	gelblich	fast kompl. Lös.
„ „	„	0	Spur
stark, „	„	0	gelblich
fast kompl. Lös.	„	0	sehr schwach gelblich
„ „ „	„	0	∅

serums auf Mittelstück. Sera nativ. Als Endstück dient gefälltes Meerschweinchenserum.

	Rinderserum	Hammelserum	Ziegenserum	Hundeserum
+ 1,0 Endst. (= 0,1 Meersch.)	f. kompl. Lös., starke Aggl.	wenig, Aggl.	mäßig, Aggl.	kompl. Lös.
+ 0,5 „	wenig, starke Aggl.	Spürchen, Aggl.	große Kuppe, Aggl.	„
+ 0,3 „	gelblich, Aggl.	gelblich, Aggl.	Zone, Aggl.	stark
+ 0,2 „	„ „	„ „	„ „	wenig
+ 0,1 „	sehr schwach gelblich, Aggl.	0, „	gelblich, Aggl.	gelblich
+ wie 1.	kompl. Lös.	gelblich	gelblich	f. kompl. Lös.
+ „ 2.	mäßig, starke Aggl.	„	„	Kuppe
+ „ 3.	sehr schwach gelblich	„	sehr schwach gelblich	gelblich

IX. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mittels Ambo-
Das Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum wurden in der Verdünnung 1:10

1.	0,2	Meerschw.-Mittelstück	(= 0,1	Ser.)	+ 0,8	Kslg.	+ 0,5 $^1/_{100}$	Amboc.	+ 1,0	Blut	} 1 Stunde bei 37°
2.	0,1	„	(= 0,05	„)	+ 1,4	„	+	„	„	+ „	
3.	0,6 $^1/_{10}$	„	(= 0,03	„)	+ 1,1	„	+	„	„	+ „	
4.	0,4 $^1/_{10}$	„	(= 0,02	„)	+ 1,4	„	+	„	„	+ „	
5.	0,2 $^1/_{10}$	„	(= 0,01	„)	+ 1,7	„	+	„	„	+ „	
6.	wie 1.				+ 1,3	„	+	0		+ „	
7.	„ 2.				+ 1,9	„	+	0		+ „	
8.	„ 3.				+ 1,6	„	+	0		+ „	

Versuch 12.

(12. VIII. 10.)

Versuch 11 wurde wiederholt mit dem Unterschiede, daß vom Amboceptor 0,15 $^1/_{10}$ ccm = 30fach lös. Dos. verwendet wurde. Als Endstück und Mittelstück diente frisch gefälltes Meerschweinchenserum. Versuchsanordnung dieselbe wie im Versuche 11.

Rinderserum, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum vom vorigen Tage im Frigo aufbewahrt.

I. Meerschweinchenendstück mit und ohne Amboceptor zeigt keine Hämolyse.

II. Meerschweinchenmittelstück auf Hämolyse geprüft:

1.	0,4	Meerschw.-Mittelst.	+ 1,6	Kslg.	+ 0,15 $^1/_{10}$	Amboc.	+ 1,0 Blut	wenig
2.	0,2	„	+ 1,8	„	+	„	+ „	Spürchen
3.	0,1	„	+ 1,9	„	+	„	+ „	gelblich
4.	0,4	„	+ 1,75	„	+	0	+ „	0
5.	0,2	„	+ 1,95	„	+	0	+ „	0
6.	0,1	„	+ 2,05	„	+	0	+ „	0

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1.	1,0 $^1/_{10}$ Serum	+ Amboceptor + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ „		„ „
3.	0,3 „ „		„ „
4.	0,2 „ „		„ „ Schleier
5.	0,1 „ „		sehr stark
6.	1,0 $^1/_{10}$ ohne Amboc.		gelblich
7.	0,15 $^1/_{10}$ Amboc. allein		0, Agglutination[1])
8.	Blut allein		0

[1]) Im Protokoll nur dort vermerkt, wo ohne Amboceptor vorhanden oder besonders intensiv.

ceptor und Meerschweinchenmittelstück im nativen Zustande auf Endstück untersucht. verwendet, das Hundeserum dagegen in der Verdünnung 1:100.

	Rinderserum $^1/_{10}$	Hammelserum $^1/_{10}$	Ziegenserum $^1/_{10}$	Hundeserum $^1/_{100}$
+ 1,0 $^1/_{10}$ Serum resp. 1,0 $^1/_{100}$ Hundeser.)	gelblich, starke Aggl.	0, Aggl.	gelblich, Aggl.	Spürchen
+ 0,5 $^1/_{10}$ Serum	sehr schwach gelblich, Aggl.	0, „	0, Aggl.	gelblich
+ 0,3 $^1/_{10}$ „	0, Aggl.	0, „	0, „	0
+ 0,2 $^1/_{10}$ „	0, „	0, „	0, „	0
+ 0,1 $^1/_{10}$ „	0, „	0, „	0, „	0
+ wie 1.	0	0	0	0
+ „ 2.	0	0	0	0
+ „ 3.	0	0	0	0

IV. Meerschweinchenendstück plus Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. Versuchsanordnung wie Vers. 5, IV.

1.	0,2 Mittelstück	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Komplement)	kompl. Lös.
2.	0,1 „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)	„ „
3.	0,6 $^1/_{10}$ „	+ 0,3 „	(= 0,03 „)	fast „ „
4.	0,4 $^1/_{10}$ „	+ 0,2 „	(= 0,02 „)	sehr stark
5.	0,2 $^1/_{10}$ „	+ 0,1 „	(0,01 „)	Spürchen
6.	wie 1. ohne Amboc.			gelblich
7.	„ 2. „	„		sehr schw. gelbl.
8.	„ 3. „	„		0

+ Amboc. + Blut

V. Rinderserum, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum auf Hämolyse geprüft. Versuchsanordnung dieselbe wie Vers. 11, V. Die Sera sind dieselben wie im Vers. 11 (Frigo).

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
1. 1,0 Konz.	Spürchen, starke Aggl.	gelblich	gelb	mäßig
2. 0,5 „	gelb, starke Aggl.	sehr schwach gelblich	gelblich	gelblich
3. 0,25 „	gelblich, starke Aggl.	do.	sehr schwach gelblich	sehr schwach gelblich
4. 0,1 „	sehr schwach gelbl.	0	0	0
5. 0,05 „	0	0	0	0

VI. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum mit 30fach lös. Dos. von Amboceptor auf Komplement untersucht. Die ersten drei in konzentriertem Zustande, das Hundeserum in Verdünnung 1:10. Versuchsanordnung analog Vers. 11, VI.

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
1. 1,0 Ser. + 0,15 $^1/_{10}$ Amb.	sehr wenig, starke Aggl.	gelblich	Spürchen	kompl. Lös.
2. 0,5 „ + „	gelblich, starke Aggl.	sehr schwach gelblich	gelblich	mäßig
3. 0,25 „ + „	do.	do.	sehr schwach gelb	wenig
4. 0,1 „ + „	sehr schwach gelblich, starke Aggl.	0	0	gelblich
5. 0,05 „ + „	0, starke Aggl.	0	0	sehr schwach gelblich

VIII. Untersuchung des Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserums auf

1.	0,2 Serumverdünnung	1:12 (= 0,1 Serum)	+ 0,8 Kslg.	+	0,15 $^1/_{10}$ Amboc.	+	1,0 Blut	½ Stunde bei 37°
2.	0,1 „	„ (= 0,05 „)	+ 1,4 „	+	„	+	„	
3.	0,6 „	1:20 (= 0,03 „)	+ 1,1 „	+	„	+	„	
4.	0,4 „	„ (= 0,02 „)	+ 1,4 „	+	„	+	„	
5.	0,2 „	„ (= 0,01 „)	+ 1,7 „	+	„	+	„	
6.	wie 1.		+ 0,95 „	+	0	+	„	
7.	„ 2.		+ 1,55 „	+	0	+	„	
8.	„ 3.		+ 1,25 „	+	0	+	„	

IX. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum auf Endstück mittels Ambo- 1:100, die übrigen Sera 1:10.

1.	0,2 Meerschweinchenmittelst.	(= 0,1 Ser.)	+ 0,8 Kslg.	+	0,15 $^1/_{10}$ Amb.	+	1,0 Blut	1 Stunde bei 37°
2.	0,1 „	(= 0,05 „)	+ 1,4 „	+	„	+	„	
3.	0,6 $^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)	+ 1,1 „	+	„	+	„	
4.	0,4 $^1/_{10}$ „	(= 0,02 „)	+ 1,4 „	+	„	+	„	
5.	0,2 $^1/_{10}$ „	(= 0,01 „)	+ 1,7 „	+	„	+	„	
6.	wie 1.		+ 0,95 „	+	0	+	„	
7.	„ 2.		+ 1,55 „	+	0	+	„	
8.	„ 3.		+ 1,25 „	+	0	+	„	

VII. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum mit Meerschweinchenendstück untersucht. Bei Vorhandensein von Normalamboceptoren und Mittelstück tritt Lösung ein. Versuchsanordnung wie Vers. 11, VII.

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
1, 1,0 Ser. + 1,0 Endst.	mäßig, starke Aggl.	gelblich	gelb	mäßig
2. 0,5 „ + „	„ „ „	„	gelblich	Spürchen
3. 0,25 „ + „	stark, „ „	„	„	gelblich
4. 0,1 „ + „	„ „ „	schwach gelblich	„	0
5. 0,05 „ + „	Spur, „ „	„ „	„	0

Mittelstück. Sera nativ. Als Endstück dient gefälltes Meerschweinchenserum.

	Rinderserum		Hammelserum	Ziegenserum	Hundeserum
+1,0 Endstück (=0,1 Kompl.)	kompl. Lös.	Aggl. d. Stromata u. Erythrocyten sehr stark [1])	stark	f. kompl. Lös.	kmpl. Lös.
+0,5 „ (=0,05 „)	sehr stark		wenig	stark	sehr stark
+0,3 „ (=0,03 „)	wenig		gelblich	mäßig	mäßig
+0,2 „ (=0,02 „)	Spürchen		„	Spur	wenig
+0,1 „ (=0,01 „)	gelblich		sehr schwach gelblich	gelb	gelb
+ wie 1.	mäßig, Aggl.		gelblich	sehr schwach gelblich	mäßig
+ „ 2.	gelblich, „		sehr schwach gelblich	do.	Spur
+ „ 3.	sehr schwach gelbl.		0	„	gelblich

ceptor und Meerschweinchenmittelstück untersucht. Hundeserum in der Verdünnung

	Rinderserum $^1/_{10}$	Hammelserum $^1/_{10}$	Ziegenserum $^1/_{10}$	Hundeserum $^1/_{100}$
+ 1,0 $^1/_{10}$ Serum (resp. $^1/_{100}$ Hundeser.)	Spürchen	gelblich	0	wenig
+ 0,5 „ „	sehr schwach gelbl.	0	0	gelblich
+ 0,3 „ „	0	0	0	0
+ 0,2 „ „	0	0	0	0
+ 0,1 „ „	0	0	0	0
+ wie 1.	sehr schwach gelbl.	0	0	0
+ „ 2.	do.	0	0	0
+ „ 3.	„	0	0	0

[1]) Röhrchen wurden öfters geschüttelt.

Überblicken wir die Resultate dieser Versuche, so ergibt sich folgendes:

Der Gehalt der einzelnen Sera an wirksamem Mittelstück ist ein verschiedener, doch ist in allen diese Komplementkomponente nachweisbar. Dagegen zeigt sich ein Defekt an Endstück. Wir begegnen also hier ähnlichen Verhältnissen wie beim Kaninchenserum. Und selbst in Seris, in denen reichlich Endstück vorhanden ist (im Hundeserum und, wie in nachstehenden Versuchen 13 und 14 gezeigt wird, im Menschenserum), zeigt sich ein Prävalieren des Mittelstückes.

Versuch 13.

(20. VII. 10.)

Untersuchung von Menschenserum auf Mittelstück und Endstück.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. $0{,}5^1/_{1000}$. Im Versuch verwendet $0{,}1^1/_{100}$ = 20fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

2 Menschensera.

Das Endstück wurde 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

I. II. Meerschweinchenendstück und Meerschweinchenmittelstück zeigen mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

III. Meerschweinchenserum nativ als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1.	$1{,}0^1/_{10}$ Kompl. + $0{,}1^1/_{100}$ Amboc.	+ Amboceptor + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ „ + „		„ „
3.	0,3 „ „ + „		„ „
4.	0,2 „ „ + „		f. kompl. Lös.
5.	0,1 „ „ + „		wenig
6.	$1{,}0^1/_{10}$ Kompl. ohne Amboc.		0
7.	$0{,}1^1/_{100}$ Amboc. allein		0
8.	1,0 Blut allein		0

IV. Meerschweinchenendstück plus Meerschweinchenmittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. Versuchsanordnung wie Vers. 5, IV.

1.	0,2 Mittelstück + 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ + 0,5 „ (= 0,05 „)		„ „
3.	$0{,}6^1/_{10}$ „ + 0,3 „ (= 0,03 „)		„ „
4.	0,4 „ „ + 0,2 „ (= 0,02 „)		stark
5.	0,2 „ „ + 0,1 „ (= 0,01 „)		gelb
6.	wie 1. ohne Amboc.		gelblich
7.	„ 2 „ „		0
8.	„ 3. „ „		0

V. Menschensera 1 und 2 ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft. Versuchsanordnung wie Vers. 11, V.

	Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser.	stark	wenig
2. 0,5 „ „	mäßig	gelblich
3. 0,25 „ „	wenig	0
4. 0,1 „ „	gelblich	0
5. 0,05 „ „	0	0

VI. Menschensera 1 und 2 mit Amboceptor auf Hämolyse geprüft. Wie Vers. 11, VI.

		Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser.	+ 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. = 10fach lös. Dos.	f. kompl. Lös.	mäßig
2. 0,5 „ „	+ do.	mäßig	wenig
3. 0,25 „ „	+ do.	Spur	gelblich
4. 0,1 „ „	+ do.	sehr schwach gelblich	0
5. 0,05 „	+ do.	0	0

VII. Menschensera 1 und 2 mit Meerschweinchenendstück und ohne Amboceptor untersucht. Wie Vers. 11, VII.

			Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenserum	bei 37°	+ 1,0 Meerschweinchenendstück	kompl. Lös.	f. kompl. Lös.
2. 0,5 „ „	bei 37°	+ 1,0 „	„ „	wenig
3. 0,25 „ „	1 Std. bei 37°	+ 1,0 „	sehr stark	Spürchen
4. 0,1 „ „	1 Std. bei 37°	+ 1,0 „	Spur	gelblich
5. 0,05 „ „	1 Std. bei 37°	+ 1,0 „	gelb	„

VIII. Menschensera 1 und 2 mit Amboceptor und Meerschweinchenendstück auf Mittelstück untersucht. Analoge Versuchsanordnung wie Vers. 11, VIII.

1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,0 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück vom Meerschweinchen	
2. 0,5 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,5 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+	do.
3. 0,25 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,75 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+	do.
4. 0,1 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,9 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+	do.
5. 0,05 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,95 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+	do.

Resultat:

	Menschenserum 1	Menschenserum 2
1.	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2.	„ „	sehr stark
3.	mäßig	mäßig
4.	wenig	wenig
5.	Spürchen	Spur

IX. Menschensera 1 und 2 mittels Amboceptor und Meerschweinchenmittelstück auf Endstück untersucht. Wie Vers. 11, IX.

											Menschenserum 1	Menschenserum 2
1.	0,2	Meerschw.-Mittelst.	+ 0,8	Kslg.	+ 0,1 $^1/_{100}$	Amb.	+ 1,0	Blut	1 Stunde bei 37°	+ 1,0 $^1/_{10}$ Ser.	komplette Lös.	mäßig
2.	0,1	„	+ 1,4	„	+	„	+	„		+ 0,5 „ „	f. kompl. Lös.	wenig
3.	0,6 $^1/_{10}$	„	+ 1,1	„	+	„	+	„		+ 0,3 „ „	mäßig	gelblich
4.	0,4 „	„	+ 1,4	„	+	„	+	„		+ 0,2 „ „	wenig	sehr schw. gelblich
5.	0,2 „	„	+ 1,7	„	+	„	+	„		+ 0,1 „ „	gelblich	0
6.	wie 1.		+ 0,9	„	+	0	+	„		+ wie 1.	f. kompl. Lös.	gelblich
7.	„ 2.		+ 1,5	„	+	0	+	„		+ „ 2.	mäßig	„
8.	„ 3.		+ 1,2	„	+	0	+	„		+ „ 3.	Spur	0

Versuch 14.

Versuchsanordnung wie Vers. 13.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 1. VI. 1fach lös. Dos. 0,25 $^1/_{100}$. Verwendet wurden 0,75 $^1/_{10}$ = 30fach lös. Dos.

Menschensera 3 und 4.

I. Meerschweinchenendstück mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

II. Meerschweinchenmittelstück zeigt starke Hämolyse, weshalb die entsprechenden Versuche mit demselben nicht angestellt wurden.

III. Menschensera 3 und 4 auf Hämolyse untersucht. Wie Vers. 11, V.

			Menschenserum 3	Menschenserum 4
1.	1,0 $^1/_{10}$ Menschenserum	ohne Amboc.	stark	wenig
2.	0,5 „ „		wenig	Spürchen
3.	0,25 „ „		Spürchen	0
4.	0,1 „ „		0	0
5.	0,05 „ „		0	0

IV. Menschensera 3 und 4 mit Amboceptor (30fach lös. Dos.) geprüft. Wie Vers. 13, VI.

							Menschenserum 3	Menschenserum 4
1.	1,0	$^1/_{10}$	Menschenser.	+ 0,75	$^1/_{10}$	Amboc.	wenig, Aggl.	gelblich, Aggl.
2.	0,5	„	„	+	„	„	gelblich	sehr schwach gelbl. Aggl.
3.	0,25	„	„	+	„	„	sehr schwach gelblich	0, „
4.	0,1	„	„	+	„	„	0	0, „
5.	0,05	„	„	+	„	„	0	0, „

V. Menschenserum 3 und 4 ohne Immunamboceptor mit Meerschweinchenendstück auf Mittelstückgehalt untersucht. Wie Vers. 11, VII.

								Menschenserum 3	Menschenserum 4
1.	1,0	$^1/_{10}$	Menschenser.	1 Std. bei 37°	+ 1,0	Endstück		kompl. Lös.	kompl. Lös.
2.	0,5	„	„		+ „	„		„ „	„ „
3.	0,25	„	„		+ „	„		„ „	stark
4.	0,1	„	„		+ „	„		sehr wenig	gelblich
5.	0,05	„	„		+ „	„		sehr schwach gelb	∅

VI. Menschensera 3 und 4 mit Immunamboceptor und Meerschweinchenendstück auf Mittelstückgehalt geprüft. Wie Vers. 11, VIII.

1.	1,0	$^1/_{10}$	Mensch.-Serum	+ 0,0	Kslg.	+ 0,75	$^1/_{10}$	Amb.	+ 1,0	Blut	1 Std. bei 37°	+ 1,0	Endst.
2.	0,5	„	do.	+ 0,5	„	+	„		+	„		+ „	„
3.	0,25	„	do.	+ 0,75	„	+	„		+	„		+ „	„
4.	0,1	„	do.	+ 0,9	„	+	„		+	„		+ „	„
5.	0,05	„	do.	+ 0,95	„	+	„		+	„		+ „	„

Resultat:

	Menschenserum 3	Menschenserum 4
1.	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2.	„ „	„ „
3.	„ „	„ „
4.	„ „	„ „
5.	„ „	f. kompl. Lös.

Zwei Cerebrospinalflüssigkeiten erwiesen sich bei der Prüfung auf einzelne Komplementbestandteile als praktisch komplementfrei. Von beiden Komponenten waren nur Spuren vorhanden. Eine Probe menschlicher Milch ergab ein negatives Resultat.

Dieses Überwiegen des Mittelstückes findet man nicht nur bei der Untersuchung mit dem verwendeten Immunamboceptor, sondern auch mit Normalamboceptoren der auf Mittelstück geprüften Sera. (Vgl. z. B. Versuch 14, Reihe III u. V.) Dies demonstriert der zu diesem Zweck angestellte Versuch 15 mit normalem Rinderserum, das einen relativ hohen Gehalt an Normalhämolysinen hat, recht deutlich. Durch Zusatz von Meerschweinchenendstück ist die Hämolyse für Kaninchen- und Meerschweinchenblut verstärkt worden, und für Ziegenblut ist das Vorhandensein von Amboceptor und Mittelstück erst zutage getreten.

Versuch 15.

(30. VI.)

Rinderserum vom 28. VI. im „Frigo" aufbewahrt. Endstück von Meerschweinchen, 1,0 = 0,1 Serum.

Meerschweinchenblut 5%, 2mal gewaschen.

Kaninchenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

									Meerschweinchenblut	Kaninchenblut	Ziegenblut
1.	1,0 1/10	Rinderser.	+ 0,0	Kslg.	+ 1,0	Blut	+ 1,0	Endstück	komplett	komplett	komplett
2.	0,5 „	„	+ 0,5	„	+	„	+	„	„	stark, Aggl.	„
3.	0,25 „	„	+ 0,75	„	+	„	+	„	Spur	Zone, „	stark
4.	0,1 „	„	+ 0,9	„	+	„	+	„	gelblich	„ „	Spürchen
5.	0,05 „	„	+ 0,95	„	+	„	+	„	„	„ „	Zone
6.	1,0 1/10	„	+ 1,0	„	+	„	+	0	komplett	stark, „	0
7.	0,5 „	„	+ 1,5	„	+	„	+	0	Spur	gelblich, Aggl.	0
8.	0,25 „	„	+ 1,75	„	+	„	+	0	gelblich	„ „	0
9.	0,1 „	„	+ 1,9	„	+	„	+	0	„	„ „	0
10.	0,05 „	„	+ 1,95	„	+	„	+	0	„	„ „	0
11.	—		2,0		+	„	+	0	gelblich	∅	0
12.	—		0		+	„	+ 2,0	Endstück	„	gelblich, Aggl.	gelblich
13.	—		1,0		+	„	+ 1,0	„	„	0	„

Durch unsere Untersuchungen über die quantitativen Mengenverhältnisse der beiden Komplementteile in verschiedenen Seris hat die oben gemachte Voraussetzung, daß das Endstück und Mittelstück auch im nativen Serum getrennt vorkommen, eine Stütze erhalten.

Es erschien uns daher notwendig, die Funktionen der beiden Komplementbestandteile bei der Hämolyse einer genauen

Analyse zu unterziehen, und wir haben zunächst Bindungsversuche angestellt, über die nun berichtet werden soll.

II.

Brand war der erste, der mit dem durch Dialyse gewonnenen Mittelstück und Endstück den grundlegenden Ehrlich-Morgenrothschen Bindungsversuch ausführte. Die Ergebnisse seiner wichtigen Untersuchungen führten ihn zu der Annahme, daß das Mittelstück die haptophore, das Endstück die zymophore Gruppe des einheitlichen Komplementes darstellt. Aus seinen Versuchen ging aber — streng genommen — nur hervor, daß sensibilisierte Blutkörperchen in einer Mittelstücklösung derart verändert werden, daß sie vom Endstück allein aufgelöst werden. Brand hat nämlich die quantitative Untersuchung der Mittelstücklösung nach der Digestion mit sensibilisiertem Blut nicht durchgeführt, und sein Schluß war daher nicht ganz berechtigt.

Um über diese Frage Klarheit zu erlangen, haben wir entsprechende Versuche angestellt.

Einige unserer diesbezüglichen Protokolle folgen:

Versuch 16.

(28. VII.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Mittelstück und Endstück gespalten. Das Mittelstück wurde in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Versuchsanordnung entspricht der von Brand angewandten (Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34, S. 7).

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Ambocceptor vom 14. VII., 1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$.

1. 100,0 Ziegenblut 5% + 0,5 Amboc. (= 10fach lös. Dos.)
2. 100,0 „ + 0,5 Kochsalzlösung

1 Stunde bei 37°.

Abzentrifugiert und mit Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

1.	1,0 sens. Blut	+	1,0	Mittelstück	(= 0,16	Serum)	+ 0,0	Kslg.
2.	„	+	0,5	„	(= 0,08	„)	+ 0,5	„
3.	„	+	0,25	„	(= 0,04	„)	+ 0,75	„
4.	„	+	0,15	„	(= 0,024	„)	+ 0,85	„
5.	„	+	0,1	„	(= 0,016	„)	+ 0,9	„
6.	„	+	0,05	„	(= 0,008	„)	+ 0,95	„
7.	„	+			—		+ 1,0	„
8.	„	+			—		+ 1,0	„

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°. Nachher wurden sie zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit sorgfältig (mit Filtrierpapier) entfernt und die Bodensätze 1, 2, 3, 6, 7, 8, in entsprechenden Mengen von Kochsalzlösung und Endstück aufgeschwemmt. Bodensatz 4 und 5 wurden wegen Verwechslung ausgeschaltet.

Untersuchung der Bodensätze:

1.	Bodensatz	1 + 2,0	Endstück	+ 1,0	Kslg.			wenig
2.	„	2 + 1,0	„	+ 2,0	„			Spur
3.	„	3 + 0,5	„	+ 2,5	„			gelb
6.	„	6 + 0,1	„	+ 2,9	„			0
7.	„	7 + 2,0	„	+ 1,0	„			sehr schwach gelblich
8.	„	8 +	—	+ 2,9	„	+ 0,1	Kompl.	komplett

Untersuchung der Abgüsse:

1.	Abguß	1 + 1,0	sens. Blut	+ 0,0	Kslg.	+ 1,0	Endstück[1])	komplett
2.	„	2 +	„	+ 0,0	„	+ 1,0	„	„
3.	„	3 +	„	+ 0,5	„	+ 0,5	„	„
4.	„	4 +	„	+ 0,7	„	+ 0,3	„	fast komplett
5.	„	5 +	„	+ 0,8	„	+ 0,2	„	mäßig
6.	„	6 +	„	+ 0,9	„	+ 0,1	„	Spürchen
7.	„	7 +	„	+ 0	„	+ 1,0	„	gelb
8.	„	8 +	„	+ 0,9	„	+ 0,1	Kompl.	komplett

Endstück und Mittelstück mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft: keine Hämolyse.

In entsprechenden Mengen zusammen sind sie gut wirksam:

1. 0,5 Endstück + 0,3 Mittelstück (= $0{,}5\,^1/_{10}$ Serum) komplett
2. 0,3 „ + 0,18 „ (= $0{,}3\,^1/_{10}$ „) fast komplett

Resultat: Von dem dargebotenen Mittelstück sind von den Blutkörperchen nur minimale Mengen gebunden worden. Die Mittelstücklösung ist ungeschwächt geblieben.

Versuch 17.

(29. VII.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$.

100,0 ccm Ziegenblut 5% + 0,5 ccm Amboceptor (10fach lös. Dos.) 1 Stunde bei 37°.

Das durch Zentrifugieren erhaltene Sediment wurde mit so viel Kochsalzlösung versetzt, daß die Blutaufschwemmung 5%ig war.

---

[1]) Das Endstück wurde überall 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1. 1,0 sens. Blut + 1,0 Mittelstück (= 0,16 Serum) + 0,0 Kslg.
2. „ + 0,5 „ (= 0,08 „) + 0,5 „
3. „ + 0,25 „ (= 0,040 „) + 0,75 „
4. „ + 0,1 „ (= 0,016 „) + 0,9 „
5. „ + — + 1,0 „
6. „ + — + 1,0 „

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°.

Nachher wurden sie zentrifugiert und die Bodensätze 2mal mit je 4,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen. Nun erst in entsprechender Menge von Endstück und Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

1. Bodensatz 1. + 1,0 Kslg. + 2,0 Endstück wenig
2. „ 2. + 2,0 „ + 1,0 „ „
3. „ 3. + 2,5 „ + 0,5 „ Spürchen
4. „ 4. + 2,8 „ + 0,2 „ gelblich
5. „ 5. + 1,0 „ + 2,0 „ „
6. „ 6. + 2,9 „ + 0,1 Komplement kompl.

Untersuchung der Abgüsse:

(Das Endstück wurde 1 Stunde nach dem Abguß zugesetzt.)

1. Abguß 1. + 1,0 sens. Blut + 0,0 Kslg. + 1,0 Endstück
2. „ 2. + „ + 0,0 „ + 1,0 „
3. „ 3. + „ + 0,5 „ + 0,5 „
4. „ 4. + „ + 0,8 „ + 0,25 „
5. „ 5. + „ + — „ + 1,0 „
6. „ 6. + „ + 0,9 „ + 0,1 Komplement

Resultat:

1. komplett
2. „
3. fast komplett
4. gelb
5. gelblich
6. komplett

Endstück und Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft: ∅.

Endstück mit Mittelstück zusammen gut wirksam:

0,5 Endstück + 0,3 Mittelstück (= 0,5 $^1/_{10}$ Kompl.) = komplett.

Resultat: Wie Vers. 16.

Versuch 18.

(30. VII.)

5 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor v. 13. VII. 1fach lös. Dos. = 0,5 $^1/_{1000}$.

100,0 Blut + 2,5 ccm Amboceptor = 50fach lös. Dos. 1 Stunde bei 37°, abzentrifugiert und wieder zu 55% Blut aufgeschwemmt.

1.	1,0 sens.	Blut + 1,0	Mittelstück	(= 0,16	Ser.)	+ 0,0	Kslg.
2.	„	+ 0,5	„	(= 0,08	„)	+ 0,5	„
3.	„	+ 0,25	„	(= 0,04	„)	+ 0,75	„
4.	„	+ 0,15	„	(= 0,024	„)	+ 0,85	„
5.	„	+ 0,1	„	(= 0,016	„)	+ 0,9	„
6.	„	+ 0,5	„	(= 0,008	„)	+ 0,95	„
7.	„	+ —	„			+ 1,0	„
8.	„	+ —	„			+ 1,0	„

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°.

1. bis 3. weisen sehr starke Agglutination auf, die anderen schwächere. Nach dem Abzentrifugieren werden die Bodensätze 2mal mit je 5,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen und nachher in entsprechender Endstück- und Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Beim Waschen tritt eine schwache Hämolyse auf, weshalb die Blutkörperchenaufschwemmung blaß und dünn ist. (Agglutinierte Blutkörperchen.)

Untersuchung der Bodensätze:

1.	Bodensatz	1. + 2,0	Endstück	+ 1,0	Kslg.		komplett
2.	„	2. + 1,0	„	+ 2,0	„		fast „
3.	„	3. + 0,5	„	+ 2,5	„		stark
4.	„	4. + 0,3	„	+ 2,7	„		Spur
5.	„	5. + 0,2	„	+ 2,8	„		0
6.	„	6. + 0,1	„	+ 2,9	„		0
7.	„	7. + 2,0	„	+ 1,0	„		0
8.	„	8. + —	„	+ 2,9	„	+ 0,1 Kompl.	kompl.

Untersuchung der Abgüsse auf freies Mittelstück.

Die Abgüsse der Röhrchen 1 bis 3 waren stark hämoglobinhaltig (entsprechend etwa einer mäßigen Hämolyse), Abgüsse 4 und 5 weniger.

1.	Abguß	1. + 1,0	sens. Blut	+ 1,0	Endstück	+ 0,0	Kslg.	kompl.
2.	„	2. +	„	+ 1,0	„	+ 0,0	„	„
3.	„	3. +	„	+ 0,5	„	+ 0,5	„	„
4.	„	4. +	„	+ 0,3	„	+ 0,7	„	stark
5.	„	5. +	„	+ 0,2	„	+ 0,8	„	wenig
6.	„	6. +	„	+ 0,1	„	+ 0,9	„	Spur
7.	„	7. +	„	+ 1,0	„	+ 0	„	„
8.	„	8. +	„	+ —	„	+ 0,9	„ + 0,1 Kompl.	kompl.

Endstück und Mittelstück allein: ∅.

Endstück mit dem Mittelstück als Komplement gut wirksam:

0,2 Endstück + 0,12 Mittelstück (= 0,2 1/10 Kompl.)
komplett (Schleier)

Resultat: Die mit 50 lösenden Amboceptordosen sensibilisierten Blutkörperchen binden das Mittelstück.

Versuch 19.

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden mit Kohlensäure in angegebener Weise in Mittelstück und Endstück gespalten.

Mittelstück wurde in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und ein Teil sofort auf Hämolyse untersucht. Da es stark allein löste, so blieb der Rest $1^1/_2$ Stunden bei 37° (= Heckersche Modifikation, die keine Hämolyse ohne Endstück zeigt).

Hammelblut-Kaninchen-Amboceptor vom 18. VI. 1 mal lös. Dos. für Ziegenblut 0,001 ccm. Ziegenblut 5%, 2 mal gewaschen.

100,0 ccm Ziegenblut 5% + 2,5 ccm Amboc. (25 mal lös. Dos.),
100,0 „ „ + 2,5 „ physiol. Kochsalzlösung,

$1^1/_2$ Stunden bei 37°. (Keine Agglutination.)

Die Blutkörperchen wurden abzentrifugiert und zu 5% in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Bindungsversuch.

1.	4,0 sens. Blut	+ 1,6	Mittelst.	„Hecker"	(= 0,8	Meerschw.-Ser.)	+ 0,4	Kslg.
2.	„	+ 0,8	„	(0,4	„	)	+ 1,2	„
3.	„	+ 0,4	„	(0,2	„	)	+ 1,6	„
4.	„	+ 0,24	„	(0,12	„	)	+ 1,76	„
5.	„	+ 0,16	„	(0,08	„	)	+ 1,84	„
6.	„	+ 0,08	„	(0,04	„	)	+ 1,2	„
7.	„	+		—			+ 2,0	„
8.	4,0 nicht sens.							
	Blut	+		—			+ 2,0	„

Die Röhrchen blieben 2 Stunden bei 37°. Nirgends Hämolyse. Durch Zentrifugieren wurden die Blutkörperchen von der Flüssigkeit getrennt:

Bodensätze = B_1, B_2 usw.

Abgüsse = A_1, A_2 usw. (A_7 und A_8 wurden nicht untersucht.)

Untersuchung der Bodensätze:

Diese wurden zunächst mit je 5,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen und dann in je 4,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Nachher wurde die der Menge des Mittelstückes entsprechende Quantität Endstück zugesetzt.

B_1

1.	1,0 ccm B_1-Aufschwemmung	+ 2,0	Endstück	+ 0,5	Kslg.
2.	„	+	—	+ 2,5	„
3.	„	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	„

Hämolyse nach 2 Stunden bei 37°.

1. kompl. Lös.
2. ∅
3. kompl. Lös.

B_2

1.	0,1 ccm B_2-Aufschwemmung	+ 1,0	Endstück	+ 1,5	Kslg.
2.	„	+	—	+ 2,5	„
3.	„	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	„

Resultat:

1. sehr stark
2. 0
3. kompl. Lös.

B_3

1.	1,0 ccm	B_3-Aufschwemmung	+ 0,5	Endstück	+ 2,0	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. Spur
2. 0
3. kompl. Lös.

B_4

1.	1,0 ccm	B_4-Aufschwemmung	+ 0,3	Endstück	+ 2,2	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. sehr schwach gelblich
2. 0
3. kompl. Lös.

B_5

1.	1,0 ccm	B_5-Aufschwemmung	+ 0,2	Endstück	+ 2,3	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. sehr schwach gelblich
2. 0
3. kompl. Lös.

B_6

1.	1,0 ccm	B_6-Aufschwemmung	+ 0,1	Endstück	+ 2,4	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. 0
2. 0
3. kompl. Lös.

B_7

1.	1,0 ccm	B_7-Aufschwemmung	+ 2,0	Endstück	+ 0,5	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. gelblich,
2. 0
3. kompl. Lös.

B_8

1.	1,0 ccm	B_8-Aufschwemmung	+ 2,0	Endstück	+ 0,5	Kslg.
2.		,,	+	—	+ 2,5	,,
3.		,,	+ 0,1	Meerschw.-Serum	+ 2,4	,,

Resultat:
1. 0
2. 0
3. gelblich

Untersuchung der Abgüsse (A_1 bis A_6).

Versuchsanordnung: Je 1,5 ccm der Abgüsse wurden mit 1,0 sensibilisierten Blutes und Kochsalzlösung 1 Stunde bei 37° digeriert und nachher die entsprechende Quantität Endstück zugesetzt.

1. 1,5 ccm von A_1 enthält 0,4 Mittelstück (= 0,2 Meerschw.-Ser.)
2. „ A_2 „ 0,2 „ (= 0,1 „)
3. „ A_3 „ 0,1 „ (= 0,05 „)
4. „ A_4 „ 0,06 „ (0,03 „)
5. „ A_5 „ 0,04 „ (= 0,02 „)
6. „ A_6 „ 0,02 „ (0,01 „)

Versuch:

1.	1,5 ccm	A_1 +	1,0 sens. Blut	+ — Kslg.	1 Std. bei 37°	+ 1,0	Endstück
2.	„	A_2 +	„	+ — „		+ 1.0	„
3.	„	A_3 +	„	+ 0,5 „		+ 0,5	„
4.	„	A_4 +	„	+ 0,7 „		+ 0,3	„
5.	„	A_5 +	„	+ 0,8 „		+ 0.2	„
6.	„	A_6 +	„	+ 0,9 „		+ 0.1	„

Resultat:

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. mäßig
5. gelblich
6. sehr schwach gelblich

Kontrollen:

Endstück auf Hämolyse geprüft:

1.	2,0 Endstück	+ 1,0 sens. Blut		Spur
2.	1,0 „	+ „		gelb
3.	2.0 „	+ 1.0 nicht sens. Blut		0
4.	1,0 „	+ „		0

Mittelstück („Hecker") auf Hämolyse geprüft:

1.	0,8 Mittelstück	+ 1,0 sens. Blut	+ 1,7 Kslg.		0
2.	0,4 „	+ „	+ 2,1 „		0
3.	0,2 „	+ „	+ 2,3 „		0
4.	0,8 „	+ 1.0 nicht sens. Blut	+ 1.7 „		0
5.	0,4 „	+ „	+ 2,1 „		0
6.	0,2 „	+ „	+ 2,3 „		0

Komplementtitration:

1	1,0 ccm Kompl. $^1/_{10}$	+ 1,0 sens. Blut	+ 1.5 Kslg.		kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ „	+ 2,0 „		„ „
3.	0,3 „	+ „	+ 2.2 „		„ „
4.	0,2 „	+ „	+ 2.3 „		„ „
5.	0,1 „	+ „	+ 2,4 „		mäßig
6.	1,0 „	+ 1,0 nicht sens. Blut	+ 1.5 „		0
7.	—	+ 1,0 sens. Blut	+ 2.5 „		0
8.	—	+ 1,0 nicht sens. Blut	+ 2.5 „		0

Mittelstück und Endstück in Mengen, die denjenigen bei der Komplementtitration entsprechen. Endstück wurde 1 Stunde nach Mittelstück zugesetzt.

1.	0,2	Mittelstück	+ 1,0	sens.	Blut	+ 1,3	Kslg.	1 Std. bei 37°	+ 1,0	Endstück
2.	0,1	„	+	„		+ 1,9	„		+ 0,5	„
3.	$0{,}6^1/_{10}$	„	+	„		+ 1,6	„		+ 0,3	„
4.	$0{,}4^1/_{10}$	„	+	„		+ 1,9	„		+ 0,2	„
5.	$0{,}2^1/_{10}$	„	+	„		+ 2,2	„		+ 0,1	„
6.	wie 1. mit nicht sens. Blut									
7.	„ 2.	„	„	„	„					
8.	„ 3.	„	„	„	„					

Resultat:

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. mäßig
5. gelblich
6. 0
7. 0
8. 0

Fassen wir die Resultate unserer Experimente zusammen, so ergibt sich, daß bei 10fach sensibilisiertem Blute in physiologischer Salzlösung nur eine minimale Bindung von Mittelstück nachweisbar war, da die Blutkörperchen durch Endstück allein entweder gar nicht oder nur sehr wenig aufgelöst wurden und die Mittelstücklösung quantitativ wirksam geblieben ist.

Erst bei 25 bis 40 lösenden Amboceptordosen wurde stets Mittelstück gebunden, da das Blut durch entsprechende Endstückmengen aufgelöst wurde und die Mittelstücklösung einen, wenn auch geringen, Defekt aufwies.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit denjenigen von Liefmann und Cohn, die nach Beendigung unserer Versuche veröffentlicht worden sind, und haben ihre Analogien in den Untersuchungen über persensibilisierte Blutkörperchen von Michaelis und Skwirsky[1]) und in den Arbeiten über die Kältetrennung innerhalb des Komplementes von Sachs und Bolkowska.[2])

---

[1]) Michaelis und Skwirsky, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 4, 1909.

[2]) Sachs und Bolkowska, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 7, 1910.

Michaelis und Skwirsky stellten nämlich fest, daß bei 40 Amboceptoreinheiten eine Trennung innerhalb des nativen Komplementes bei saurer Reaktion und Bruttemperatur erfolgt, und Sachs und Bolkowska zeigten, daß bei 0° und höherem Amboceptorgehalt das gleiche zu erzielen ist, während bei geringer Immunkörpermenge die Trennung ausbleibt. Guggenheimer hat festgestellt, daß im salzfreien Medium die Trennung gleichfalls nur unter diesen Bedingungen erfolgen kann.

Diese Tatsachen sind also mit den Resultaten unserer Versuche und derjenigen von Liefmann und Cohn im Einklang. Wir wollen uns mit der Mitteilung dieser Ergebnisse begnügen, ohne auf die Analyse dieser interessanten Erscheinung näher einzugehen, da dieselbe bereits von Liefmann und Cohn in erschöpfender Weise durchgeführt worden ist. So viel muß nur hervorgehoben werden, daß die Ergebnisse dieser Experimente mit den herrschenden Anschauungen über den Mechanismus der Komplementwirkung in einem gewissen Widerspruche stehen. Der Ablauf der Vorgänge bei der Auflösung der roten Blutkörperchen scheint ein komplizierterer zu sein, als die Ehrlich-Morgenrothsche Theorie annahm.

III.

Die von Flexner und Noguchi[1]), Noc[2]) sowie Morgenroth und Kaya[3]) studierte komplementzerstörende Fähigkeit des Kobragiftes schien uns dazu geeignet zu sein, über die Natur der beiden Komplementbestandteile etwas zu erfahren.

Nachdem im Kobragifte eine „Lecithinase" nachgewiesen wurde, lag doch der Gedanke nahe, dieses Ferment auch für die Komplementzerstörung verantwortlich zu machen, wobei die seit langem vermutete „Lipoid"natur des Komplements in anderem Gewande wiederum auftauchen würde.

Von unseren Versuchen, die alle das gleiche Resultat zeigten, möge einer folgen:

---

[1]) Flexner und Noguchi, The Journ. of exper. Med. 6, 1903.
[2]) Noc, Annales de l'Inst. Pasteur 19, 1905.
[3]) Morgenroth und Kaya, diese Zeitschr. 8, Heft 2 bis 4.

Versuch 20.
(21. VII.)

Kobragiftlösung 1% (in physiologischer Kochsalzlösung + Glycerin āā). Frisches Meerschweinchenserum.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums mittels CO_2 in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

I. Blut **sofort** zugesetzt.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+	Kslg.	+	Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+	0,8	+	1,0	kompl. Lös.
2.	„	+	1,0 1/10	+	—	+	„	„ „
3.	„	+	0,5 „	+	0,5	+	„	wenig
4.	„	+	0,25 „	+	0,75	+	„	Spur
5.	„	+	0,1 „	+	0,9	+	„	gelblich
6.	„	+	0,05 „	+	0,95	+	„	„

II. Blut erst zugesetzt, nachdem die Kobragift-Meerschweinchenserum-Mischungen 3 Stunden bei 37° verweilt hatten.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+	Kslg.	3 Std. bei 37°	+ Kslg.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+	0,8		1,0	+ 1,0	gelblich
2.	„	+	1,0 1/10	+	—		„	+ „	gelb
3.	„	+	0,5 „	+	0,5		„	+ „	wenig
4.	„	+	0,25 „	+	0,75		„	+ „	„
5.	„	+	0,1 „	+	0,9		„	+ „	gelb
6.	„	+	0,05 „	+	0,95		„	+ „	gelblich

III. Versuchsreihe wie II mit nachträglichem Zusatz von Endstück und Blut.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+	Kslg.	3 Std. bei 37°	+ Endst.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+	0,8		1,0	+ 1,0	Spürch.
2.	„	+	1,0 1/10	+	—		„	+ „	Spur
3.	„	+	0,5 „	+	0,5		„	+ „	sehr stark
4.	„	+	0,25 „	+	0,75		„	+ „	do.
5.	„	+	0,1 „	+	0,9		„	+ „	mäßig
6.	„	+	0,05 „	+	0,95		„	+ „	wenig

IV. Versuchsreihe wie II mit nachträglichem Zusatz von Mittelstück und Blut.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+	Kslg.	3 Std. bei 37°	+ Mittelst.	+ Kslg.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+	0,8		0,4	+ 0,6	+ 1,0	kompl. Lös.
2.	„	+	1,0 1/10	+	—		„	+ „	+ „	„
3.	„	+	0,5 „	+	0,5		„	+ „	+ „	fast „
4.	„	+	0,25 „	+	0,75		„	+ „	+ „	stark
5.	„	+	0,1 „	+	0,9		„	+ „	+ „	Kuppe
6.	„	+	0.05 „	+	0,95		„	+ „	+ „	„

Kontrollen:

1. Blut + Kslg.	0
2. 2,0 Endstück + Blut	gelblich
3. 1,0 „ + „	„
4. 0,8 Mittelstück + Blut	0
5. 0,4 „ + „	0
6. 1,0 1/10 Kobragift + Blut	0
7. 0,5 „ „ + „	0
8. 0,2 Meerschweinchenserum + Blut	gelblich
9. 1,0 Endstück + 0,4 Mittelst. + Blut	wenig

Überblicken wir das Experiment, so sehen wir, daß durch das Kobragift nur das Mittelstück zerstört wird. Das Endstück bleibt intakt.

Gleichzeitig geht aber im Meerschweinchenserum eine andere Veränderung vor sich, und zwar derart, daß durch die Einwirkung des Kobragiftes ein Hämolysin entsteht, dessen Wirkung durch Endstück verstärkt wird. Die Annahme liegt nahe, die Spaltung des Lecithins dafür verantwortlich zu machen und die Verstärkung durch Endstück als „Beschleunigungsphänomen" aufzufassen, wie wir es durch die Untersuchungen von v. Liebermann[1]), Dungern und Coca[2]), F. Sachs[3]) u. a. kennen gelernt haben.

Auffällig ist, daß die Bildung des Hämolysins unter der Einwirkung des Kobragiftes nur bei bestimmter Konzentration des Meerschweinchenserums nachweisbar ist.

Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die hierbei bestehenden Verhältnisse aufzuklären.

Doch liegt es jedenfalls nahe, das Mittelstück mit Lipoiden in irgend eine Beziehung zu bringen.

Die isolierte Mittelstückzerstörung durch das Kobragift bildet außerdem eine neue Stütze für die Behauptung, daß die beiden Komplementbestandteile im nativen Serum getrennt vorkommen, da sonst diese Tatsache ohne die letztere Annahme nicht leicht verständlich wäre.

Zusammenfassung.

1. Der Gehalt der Normalsera (Ziege, Hammel, Rind, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Mensch) an den beiden Komple-

[1]) v. Liebermann, Arch. f. Hygiene 62, 1907; diese Zeitschr. 4, 1907.
[2]) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1908.
[3]) F. Sachs, diese Zeitschr. 12, 1908.

mentbestandteilen ist ein verschiedener. Endstück fehlt in manchen, doch Mittelstück ist stets nachweisbar und fehlt in keinem der untersuchten Sera. Die bis jetzt geübte Methode der Komplementbestimmung mißt nur den Gehalt an Endstück, nicht dagegen den an Mittelstück. Die beiden Komplementbestandteile sind im nativen Serum getrennt nebeneinander vorhanden.

2. Im Meerschweinchenserum befinden sich Endstück und Mittelstück in ungefähr äquivalenten Mengen. Sie können sich auch bis zu einem gewissen Grade bei der Hämolyse funktionell vertreten, insbesondere kann Endstück das Mittelstück ersetzen.

3. Das Mittelstück des Kaninchen-, Rinder-, Hunde-, Menschen-, Ziegen- und Hammelserums ist durch Meerschweinchenendstück ergänzbar und zeigt sich nicht nur mit einem Immunamboceptor, sondern auch mit Normalamboceptoren wirksam.

4. Das isolierte Meerschweinchenmittelstück wird von unter 10 Amboceptoreinheiten sensibilisierten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung wenig oder gar nicht gebunden (Liefmann und Cohn). Erst bei 25 bis 40 Amboceptoreinheiten ist eine erheblichere Bindung nachweisbar.

5. Das Kobragift zerstört nur das Mittelstück des nativen Serums, das Endstück läßt es intakt. Gleichzeitig entsteht im Meerschweinchenserum ein Hämolysin.

Über die Hemmung der Suprareninglucosurie und der sekretorischen Nierenleistung durch peritoneale Reize.

Von

Otto von Fürth und **Carl Schwarz** (Wien).

(Ausgeführt mit Unterstützung des Elizabeth-Thompson-Science-Fund, Boston.)

(*Eingegangen am 14. Januar 1911.*)

I. Einleitung.

Seitdem Blum im Jahre 1901 die wichtige Beobachtung gemacht hatte, daß die Injektion von Nebennierenpräparaten imstande ist, glucosurisch zu wirken, hat diese Erscheinung immer und immer wieder das Interesse zahlreicher Forscher in Anspruch genommen. In den letzten Jahren ist insbesondere die Frage in den Vordergrund gerückt, ob man berechtigt sei, in der Adrenalinglucosurie eine Äußerung der normalen physiologischen Wirkung des „inneren Sekretes" der Nebenniere zu erblicken. Andererseits ist aber, angesichts der dominierenden Stellung, die die Bauchspeicheldrüse seit der Entdeckung des Pankreasdiabetes in der Lehre vom Kohlenhydratstoffwechsel einnimmt, leicht verständlich, daß man sich bemühte, über etwaige Beziehungen der innersekretorischen Tätigkeit des Pankreas und der Nebenniere Aufklärung zu erlangen.[1])

Die letztgenannten Bemühungen schienen zu einem greifbaren Resultate geführt zu haben, als Zuelzer[2]) zeigen konnte,

[1]) Vgl. die neue Zusammenstellung der einschlägigen Literatur von G. Bayer in Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse der pathologischen Anatomie 14, 100 ff., 1910.

[2]) G. Zuelzer, Verhandl. d. Kongr. f. innere Med. 1907, 258. — Experimentelle Untersuchungen über den Diabetes. Berl. klin. Wochenschr. 1907, 474.

daß einerseits bei pankreaslosen Tieren die Glucosurie ausbleibt, wenn man die Nebennierenvenen unterbunden hat und daß andererseits Injektionen von Pankreasextrakten die Adrenalinglucosurie hindern.

„Während das Adrenalin", sagt Zuelzer, „eine Zuckerausscheidung der Leber bedingt, ist der Pankreassaft, das Pankreasferment, dazu da, diese „Nebennierenferment"wirkung zu neutralisieren. War diese Annahme richtig, so mußte, wenn ich gleichzeitig einem gesunden Kaninchen Nebennierensaft oder Adrenalin in einer die Glucosurie hervorrufenden Menge und andererseits Pankreasextrakt oder ein Pankreaspräparat, das ich durch Entfernung der Eiweißkörper entgiftet hatte, injizierte, die Zuckerausscheidung notwendigerweise fortfallen... Diese Versuche habe ich ungezählte Male gemacht. Es gelang mir dauernd, mit einer bestimmten Menge Pankreasextrakt oder Pankreaspräparat den Nebennierendiabetes mit Sicherheit zu unterdrücken."

Die Beobachtungen von Zuelzer sind von vielen Seiten her bestätigt worden, so zuerst (allerdings mit wechselndem Erfolge) von Biedl und Offer[1]), sodann von Frugoni[2]), Makaroff[3]), von Gautrelet[4]) (der sie mit dem Cholingehalte des Pankreas in Zusammenhang bringen wollte) Forschbach[5]) und insbesondere auch von Gläßner und Pick[6]). An der Erscheinung als solcher ist also sicherlich nicht zu zweifeln.

---

[1]) Biedl und Offer, Über die Beziehungen der Ductuslymphe zum Zuckerhaushalte. Hemmung der Adrenalinwirkung durch Lymphe. Wiener klin. Wochenschr. 1907, 1530.

[2]) C. Frugoni, Adrenalinglucosurie und ihre Beeinflussung durch den Extrakt und den Saft des Pankreas. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 35, S. 1906; vgl. auch Arch. ital. de Biol. 4, 209, 1908.

[3]) Makaroff, La question du diabète produit par l'adrénaline. La Presse Médicale, 8. Juillet 1908, 434.

[4]) J. Gautrelet, Choline et Glucosurie adrénalique. Compt. rend. Soc. Biol. 65, 173, 1908. Ibid. 174.

[5]) J. Forschbach (Med. Univ.-Klinik, Breslau), Versuche zur Behandlung des Diabetes mellitus mit dem Zuelzerschen Pankreashormon. Deutsche med. Wochenschr. 35, 2053, 1909.

[6]) K. Gläßner und Pick, Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung von Pankreas und Nebennieren. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 6, 1909.

Die letztgenannten Autoren stellten auch fest, daß die Adrenalinglucosurie ebenso wie durch Pankreasextrakt auch durch Pankreassaft gehemmt werden könne, und zwar auch (durch örtliche von der Adrenalininjektion getrennte) subcutane Beibringung des letzteren.

Zuelzer[1]) bemühte sich nun weiterhin, aus Pankreas ein Präparat zu gewinnen, das eine therapeutische Anwendung beim menschlichen Diabetes gestatten könnte. Dieses Bemühen wurde durch die hochgradige Toxizität der Pankreaspräparate wesentlich erschwert. Immerhin glaubte Zuelzer ein „Pankreashormon" in Händen zu haben, das bei intravenöser (!) Einverleibung in einer Reihe von Diabetesfällen die Ausscheidung des Zuckers, resp. der Acetonkörper vorübergehend gänzlich zu unterdrücken vermochte, wobei jedoch nicht unerwähnt bleiben soll, daß die intravenöse Injektion, wie auch Forschbach[2]) bei Wiederholung der Zuelzerschen Versuche an Diabetikern gefunden hat, oft von Schüttelfrost, mehrtägigem Fieber und hochgradiger Prostration gefolgt war.

In Weiterverfolgung des Gedankenganges, demzufolge das innere Sekret des Pankreas eine Hemmungswirkung auf das innere Sekret der Nebenniere ausüben sollte, gelangte Zuelzer zu der Hypothese, daß der Pankreasdiabetes eigentlich nichts anderes sei als ein positiver Nebennierendiabetes, d. h. auf einer vermehrten Zuckermobilisierung durch die ungehemmte Wirkung des dem Blute in normaler Weise zuströmenden Adrenalins beruhe.

Auch Eppinger, Falta und Rudinger[3]) haben in ihren Untersuchungen über die Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion die Zuelzerschen Versuche als eine direkte Stütze ihrer Auffassung betreffend die wechselseitige physiologische Hemmungswirkung zwischen Pankreas und chromaffinem System

---

[1]) G. Zuelzer, M. Dohrn und A. Marxer, Neuere Untersuchungen über den experimentellen Diabetes. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 32, S. 1380. — G. Zuelzer, Über Versuche einer spezifischen Fermenttherapie des Diabetes. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5, 306, 1908.

[2]) Forschbach, l. c.

[3]) Eppinger, Falta und Rudinger, Über die Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion. Zeitschr. f. klin. Med. 66, 27 u. 28, 1908.

angesehen: „Die wichtigste Wirkung der Exstirpation des Pankreas ist die direkte, das heißt der Ausfall des die Zuckerverbrennung hauptsächlich herbeiführenden inneren Sekretes.... Indirekte Wirkungen erfolgen nun ... durch den Wegfall der intensiveren Hemmung auf das chromaffine System. Dadurch Überfunktion des chromaffinem Systems mit konsekutiver, übermäßiger und überstürzter Mobilisierung der Kohlenhydrate.... Zuelzer hat gezeigt, daß nach Injektion einer entsprechenden Menge Pankreasextrakt Adrenalin bei Kaninchen nicht mehr glucosurisch wirkt. Zuelzer deutet dies so, daß durch das Pankreassekret das Adrenalin im Körper entgiftet wird. Unseres Erachtens ist diese Entgiftungstheorie nicht notwendig. Die Tatsache erklärt sich ungezwungen aus unserem Schema: Der infolge der Überfunktion von chromaffinem System im Übermaß mobilisierte Zucker kann bei gleichzeitiger Überfunktion von Pankreas noch verbrannt werden. Bei entsprechender Dosierung halten sich Überfunktion von Pankreas und chromaffinem System das Gleichgewicht."

Unter der Voraussetzung, daß die Lymphe des Ductus thoracicus das für die normale Zuckerverbrennung erforderliche innere Pankreassekret enthalte, prüften ferner Biedl und Offer[1]) den Einfluß von Hundelymphe auf die Adrenalinglucosurie; sie fanden nach Anwendung entsprechend großer Dosen eine erhebliche Verminderung, unter Umständen auch eine völlige Aufhebung derselben.

Alle Schlußfolgerungen, die aus den vorerwähnten Untersuchungen gezogen worden sind, basieren auf der Annahme, daß die Aufhebung der Adrenalinglucosurie durch die Injektion von Pankreaspräparaten eine durchaus eigentümliche und spezifische Organwirkung sei, die mit der physiologischen Wirkung des „inneren Sekretes" der Bauchspeicheldrüse im innigsten Zusammenhange stehe.

Gewisse Zweifel in bezug auf diesen wichtigen Punkt, die auch das Studium der einschlägigen Originalarbeiten nicht zu zerstören vermochte, haben uns nun veranlaßt, diese Frage einer kritischen und experimentellen Prüfung zu unterziehen.

---

[1]) l. c. Vgl auch A. Biedl, Innere Sekretion. Wien 1910, S. 206.

Wir hatten gelegentlich einer früheren Arbeit[1]), die den Einfluß intraperitonealer Injektionen von Trypsin und Pankreasgewebe auf die Stickstoffausscheidung und den Eiweißzerfall zum Gegenstande hatte, in reichlichem Maße Gelegenheit, uns von der hochgradig toxischen Wirkung derartiger Injektionen zu überzeugen. Es drängte sich uns daher die Frage auf, ob nicht etwa ein heftiger peritonealer Reiz als solcher imstande sei, die Suprareninglucosurie zu hemmen.

Daß das Eintreten bzw. Ausbleiben der Suprareninglucosurie von den mannigfachsten Schädlichkeiten beeinflußt wird, geht aus zahlreichen Literaturangaben hervor. So vermochten Biedl und Offer[2]) durch Injektion von Hirudin und Krebsmuskelextrakt, Tomaczewski und Wilenko[3]) durch verschiedene Lymphagoga der ersten Ordnung, Gläßner und Pick[4]) durch Wittepepton, Aronsohn[5]) durch künstliches Fieber, Ellinger und Seelig[6]) durch Nierenschädigungen, Pollak[7]) durch Diuresenhemmung die Suprareninglucosurie zu unterdrücken.

Es sei vorausschickend bemerkt, daß unsere Versuche zu dem Resultate geführt haben, daß zum mindesten die Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Injektion von Pankreaspräparaten durch den gesetzten peritonealen Reiz eine vollkommen ausreichende Erklärung findet und zu ihrer Deutung keineswegs der Annahme eines geheimnisvollen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere bedarf.

---

[1]) O. v. Fürth und C. Schwarz, Über den Einfluß intraperitonealer Injektionen von Trypsin und Pankreasgewebe auf die Stickstoffausscheidung und den Eiweißzerfall. Diese Zeitschr. 20, 384, 1909.

[2]) l. c.

[3]) Tomaczewski und Wilenko, Beitrag zur Kenntnis der antagonistischen Wirkung des Adrenalins und der Lymphagoga. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 26, 1221.

[4]) Gläßner und Pick, l. c.

[5]) Aronsohn, Die Zuckerausscheidung nach Adrenalininjektionen und ihre Beeinflussung durch künstlich erzeugtes Fieber. Virchows Archiv 174, 383.

[6]) Ellinger und Seelig, Der Einfluß von Fieber, Infektion und Nierenschädigung auf die Suprareninglucosurie. Münch. med. Wochenschr. 1905, 499.

[7]) L. Pollak, Experimentelle Studien über den Adrenalindiabetes. Arch. f. experm. Pathol. u. Pharmakol. 61, 1909.

II. A. Wiederholung des Zuelzerschen Fundamentalversuches nach Vorbehandlung mit Trypsin.

Um die Toxizität großer Pankreasdosen nach Möglichkeit auszuschalten, gingen wir zunächst so vor, daß wir das Versuchstier einer immunisatorischen Vorbehandlung nach dem Vorgange von Achalme durch intraperitoneale Injektion steigender Trypsindosen unterwarfen. Bezüglich der Einzelheiten dieses Vorganges sowie der aseptischen Durchführung der Injektion von Pankreasgewebe sei auf unsere vorerwähnte Publikation[1]) verwiesen.

1. Versuch.

Hund von 7,700 kg. Gleichmäßig mit 250 g Fleisch und 40 g Reis täglich gefüttert. Erhält am 14. X. 7 mg Adrenalin subcutan, worauf er in normaler Weise mit Glucosurie reagiert (Harn enthält 1,3% Zucker). Der Hund erhält nunmehr am 19. X. 0,5 g Trypsin, am 21. X. 1 g, am 23. X. $1^1/_2$ g, am 28. X. 2 g, am 6. XI. 2 g, am 25. XI. und 22. XII. $2^1/_2$ g Trypsin Grübler intraperitoneal, ferner am 18. II. 1909 5 g feinst zerkleinertes Rindspankreas, am 22. II. 10 g Pankreas, am 3. III. 20 g Pankreas intraperitoneal. Der in dieser Weise in ausgiebigster Weise immunisatorisch vorbehandelte Hund erhielt am 16. III. um $^1/_2$3 Uhr nachmittags 10 g frisches Pankreas intraperitoneal und einige Stunden später, um 7 Uhr abends $7^1/_2$ mg Suprarenin; der nunmehr ausgeschiedene Harn war zuckerfrei. Die Suprareninglucosurie war also prompt gehemmt worden.

Es wurde nunmehr aus 15 g feingehacktem Pankreas ein Extrakt durch Auskochen mit Alkohol hergestellt, der Alkohol eingedampft, der fettige Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert. Dieses Extrakt wurde zugleich mit $7^1/_2$ g Suprarenin am 22. III. injiziert. Wie vorauszusehen, erwies sich der Kochextrakt ganz wirkungslos und reagierte der Hund mit der Ausscheidung eines sehr zuckerreichen Harnes (Tagesmenge 180 ccm mit einem Gehalte von 4% Zucker $= 7^1/_2$ g Zucker).

2. Versuch.

Hund von 5700 g, täglich mit 250 g Fleisch unter Zulage von etwas Fett gefüttert. Wurde am 25. I. 1909 mit 0,5 g Trypsin, am 9. II. mit 1 g, am 27. III. mit $1^1/_2$ g, am 10. IV. mit 2 g, am 26. IV. mit $2^1/_2$ g Trypsin, am 13. V. mit 3 g Pankreas, am 21. VI. mit 10 g Pankreas vorbehandelt. Am 9. VII. reagierte er auf die Injektion von 3 mg Suprarenin mit reichlicher Zuckerausscheidung. Am 12. VII. erhielt er um 11^h vorm. 10 g Pankreas intraperitoneal, um 4^h nachm. 3 mg Suprarenin; der am nächsten Tage ausgeschiedene Harn war zuckerfrei. Also auch

[1]) l. c. Diese Zeitschr. 20, 386.

hier prompte Hemmungswirkung. 2 Tage darauf wurde wieder dieselbe Suprarenindosis, jedoch ohne Pankreasbeigabe injiziert. Nunmehr reichliche Zuckerausscheidung.

3. Versuch.

Hund, täglich mit 250 g Fleisch und 40 g Fett gefüttert. Vorbehandlung: 3. IV. $^1/_2$ g, 10. IV. 1 g, 26. IV. $1^1/_2$ g, 5. V. 2 g, 24. V. $2^1/_2$ g Trypsin, 27. VI. 5 g Pankreas intraperitoneal. Am 7. VII. (Hunger) 4^h nachm. 9 mg Suprarenin. Der am nächsten Tage gesammelte Harn enthält 28,6 g Zucker. Am 12. VII. Hunger; um 11^h vorm. 10 g Pankreas intraperitoneal; um 4^h nachm. 9 mg Suprarenin. Der am nächsten Tage gesammelte Harn war zuckerfrei. 2 Tage darauf erhielt der Hund, wiederum im Hungerzustande, abermals 9 mg Suprarenin, aber diesmal ohne Pankreas; er reagierte mit einer Ausscheidung von 18,2 g Zucker (Zuckerbestimmungen nach Bertrand).

Ein Parallelversuch wurde mit einem in ganz gleicher Weise vorbehandelten Hunde in der Art vorgenommen, daß derselbe im Hungerzustande statt Suprarenin Phlorizin erhielt. Er schied nun, nachdem er am 9. VII. um 4^h $^1/_2$ g Phlorizin subcutan erhalten hatte, im Laufe desselben und des nächsten Tages im ganzen 20 g Zucker mit dem Harne aus. Am 11. VII. war der Harn wieder zuckerfrei. Am 14. VII. ließen wir den Hund wieder hungern und gaben ihm um 11^h 10 g Pankreas intraperitoneal, um 4^h nachm. $^1/_2$ g Phlorizin subcutan. Wider Erwarten wurde die Phlorizinglucosurie durch das Pankreas nicht nur nicht aufgehoben, vielmehr gesteigert, derart, daß im ganzen etwa 50 g Zucker eliminiert wurden.

4. Versuch.

Hund, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig gefüttert. Reagiert am 24. X. 1909 auf subcutane Injektion von 5 mg Suprarenin mit der Ausscheidung von 3,4 g Zucker (545 Harn mit einem Gehalte von 1,62% Zucker). Er wird am 20. X. mit 0,8 g Trypsin, am 5. XI. mit $1^1/_2$ g Trypsin, am 19. XI. mit 2 g Trypsin, am 25. XI. mit 5 g Pankreas vorbehandelt. Am 3. XII. um 11^h vorm. erhält er 10 g Pankreas intraperitoneal und 6 Stunden später 5 mg Suprarenin sowie auch gleichzeitig 1 g Chloralhydrat injiziert. Der am nächsten Tage gesammelte Harn ist zuckerfrei.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich sonach, daß es trotz ausgiebigster immunisatorischer Vorbehandlung mit Trypsin, bzw. Pankreas stets gelungen ist, die Suprareninglucosurie durch vorherige intraperitoneale Injektion von feinzerkleinertem Pankreasgewebe prompt zu hemmen. Wir vermochten also den Zuelzerschen Fundamentalversuch als solchen vollkommen zu bestätigen. Dagegen fiel ein Versuch, die Phlorizinglucosurie durch Pankreasinjektion zu hemmen, negativ aus.

B. Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Terpentin- und Aleuronat-Injektionen.

Da die intraperitoneale Injektion von Pankreasgewebe, die in so prompter Weise eine Hemmung der Suprareninglucosurie herbeizuführen vermochte, vermöge der Wirkung des tryptischen Fermentes regelmäßig mit einer sehr heftigen peritonealen Reizung einhergeht und häufig Fettgewebsnekrose sowie ausgedehnte exsudative und adhäsive Entzündungen zur Folge hat, lag es nahe, zu versuchen, ob nicht etwa auch einfache peritoneale Reize anderer Art die Suprareninglucosurie in ähnlicher Weise zu beeinflussen vermögen. Als solche Reize wählten wir die Injektion von Terpentinöl sowie von Aleuronat-Suspensionen. Es gelang nun tatsächlich, wenn auch nicht immer, so doch in der Mehrzahl der Versuche einen positiven Effekt zu erzielen. Wir teilen eine Anzahl derartiger positiver Versuche im folgenden mit.

1. Versuch.

Hund, $7^1/_2$ kg, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig gefüttert. Reagiert am 19. X. 1909 auf Injektion von 4 mg synthet. Suprarenins mit einer Ausscheidung von 6,8 g Zucker (470 ccm Harn mit 1,45% Zucker). Am 15. X. ist der Harn wieder zuckerfrei. Am 18. X. erhält das Tier eine Injektion von 10 g steriler Rindsleber, die in der gleichen Weise, wie wir es mit dem Pankreas zu tun pflegten, mit der sterilisierbaren Zerreibungsmaschine [Modell des hygienischen Institutes in Berlin[1])] auf das feinste zerkleinert worden war. Eine 2 Stunden später gemachte Suprarenininjektion war von einer Zuckerausscheidung von 1,76 g (220 ccm Harn mit 0,8% Zucker) gefolgt. Die Injektion von Lebergewebe vermochte sonach die Suprareninglucosurie nicht zu verhindern.

Am 12. XI. erhielt der Hund 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 6 Stunden später 4 mg Suprarenin. Am nächsten Tage fanden sich 300 ccm zuckerfreien Harnes vor.

Am 16. XI. reagierte der Hund auf eine Injektion von 4 mg Suprarenin in normaler Weise mit einer Ausscheidung von 3,27 g Zucker (385 Harn mit 0,85% Zucker).

2. Versuch.

Ein Rattler von $5^1/_2$ kg Gewicht wird mit 200 g Fleisch und 20 g Fett regelmäßig gefüttert. Sein Harn ist zuckerfrei. Er reagiert am 13. X. 1909 auf eine Injektion von 3 mg synthetischen Suprarenins in

[1]) Vgl. Katalog der Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Nr. 147.

normaler Weise mit einer Ausscheidung von 4,18 g Zucker (216 ccm Harn mit 1,9% Zucker). Am 15. X. ist der Harn wieder zuckerfrei.

Am 18. X. werden 10 g steriler, feinst zerkleinerter Rindermilz intraperitoneal injiziert und 2 Stunden später 3 mg Suprarenin. Die darauffolgende Zuckerausscheidung beträgt 3,05 g (250 ccm Harn mit 1,22% Zucker).

Am 7. XII. um 9^h früh wird 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal injiziert, um $3^1/_2{}^h$ $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Um 5^h geben wir dem Hunde, um (aus später zu erörternden Gründen) eine ausgiebige Diurese zu erzielen, 1 g Diuretin mit 350 ccm Wasser per Schlundsonde; diesmal bleibt die Hemmung der Glucosurie aus: In dem in reichlicher Menge angesammelten Harne fand sich 2,1 g Zucker (605 ccm mit 0,35% Zucker).

Am 9. XII. erhält der Hund neuerlich $3^1/_2$ mg Suprarenin und reagiert prompt mit der Ausscheidung von 3,78 g Zucker (310 ccm Harn mit 1,22% Zucker. Die folgenden Tage ist der Harn wieder zuckerfrei.

Am 18. XII. erhält der Hund wieder 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 6 Stunden später $3^1/_2$ mg Suprarenin, diesmal ohne Zusatz eines Diureticums. Der an den beiden darauffolgenden Tagen gesammelte Harn ist zuckerfrei.

3. Versuch.

Ein Foxterrier von 4100 g Gewicht erhält am 20. XI. 1909 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 8 Stunden später 2 mg Suprarenin. Die normale Zuckerausscheidung bleibt aus. 8 Tage später wird der Hund tot aufgefunden.

4. Versuch.

Hund von $6^1/_2$ kg, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig genährt, reagiert am 28. X. 1909 auf Injektion von 3 mg Suprarenin (subcutan) mit Ausscheidung von 5 g Zucker (500 ccm Harn mit 1% Zucker).

Am 6. XI. werden ihm um 11^h vorm. 20 ccm einer dünnen Aleuronat-Emulsion intraperitoneal injiziert, sodann um 9^h abends 3 mg Suprarenin subcutan. Der in den folgenden Tagen gesammelte Harn ist zuckerfrei, und auch noch am 13. XI. vermag eine Injektion der gleichen Suprareninmenge keine Glucosurie auszulösen.

Dagegen hat am 30. XI. die Injektion von 3 mg Suprarenin die Ausscheidung von 5,86 g Zucker (335 ccm Harn mit 1,75% Zucker) zur Folge.

5. Versuch.

Rattler von $5^1/_2$ kg. Am 20. XI. Injektion von 20 ccm einer dünnen Aleuronat-Emulsion intraperitoneal und 8 Stunden später $2^1/_2$ mg Suprarenin subcutan: keine Zuckerausscheidung. Auch eine am 22. XI. vorgenommene Wiederholung der Suprarenininjektion blieb ohne Effekt. Dagegen war eine solche am 30. XI. von einer Zuckerausscheidung von 1,34 g gefolgt.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht mit Sicherheit hervor, daß unter Umständen ein peritonealer Reizzustand, wie er durch die Injektion von Terpentinöl oder Aleuronat künstlich hervorgerufen werden kann, geeignet ist, eine Hemmung der Suprarenin-Glucosurie herbeizuführen, ähnlich derjenigen, wie sie nach intraperitonealer Injektion von Pankreas zur Beobachtung gelangt.

III. Über den Einfluß peritonealer Reize auf die Diurese und die Ausscheidung krystalloider Substanzen.

Als wir nach Feststellung der Tatsache, daß peritoneale Reize eine Hemmung der Adrenalinglucosurie herbeizuführen vermögen, nunmehr versuchten, uns über die Ursache dieser Erscheinung klar zu werden, wurde unsere Aufmerksamkeit durch eine wichtige, aus dem Wiener pharmakologischen Institute kürzlich hervorgegangene Untersuchung Leo Pollaks[1]) nach einer bestimmten Richtung hingelenkt. Der genannte Autor hat nämlich die Tatsache festgestellt, daß der Eintritt einer Suprarenin-Glucosurie im hohen Grade von der gleichzeitig bestehenden Diurese beeinflußt wird. Während ein Blutzuckerstand von mehr als 0,25% beim Kaninchen auch ohne gleichzeitige Diuresteigerung zu Glucosurie führt, kommt bei einem Blutzuckergehalte von 0,15 bis 0,25% eine Glucosurie nur dann zustande, wenn gleichzeitig kräftige Diurese besteht.

Es lag nun nahe, daran zu denken, daß die Hemmung der Suprareninglucosurie durch peritoneale Reize etwa mit einer durch die letzteren herbeigeführten Diuresenhemmung zusammenhängen könnte.

Über die Beeinflussung der Zirkulationsverhältnisse in der Niere durch Reizung zentripetaler Nerven liegen Beobachtungen von Roy und von Bradford vor,[2]) und zwar wurde eine Kontraktion der Niere durch Reizung des zentralen Ischiadicus- und Vagusstumpfes, in mäßigem Grade auch durch

---

[1]) Leo Pollak, Experimentelle Studien über Adrenalin-Diabetes (Aus dem pharmakologischen Institute in Wien). Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 149, 1909.

[2]) Vgl. R. Melzners Artikel über Nierenabsonderung in Nagels Handb. d. Physiol. 2, 282, 1907.

Reizung des zentralen Stumpfes eines Intercostalnerven ausgelöst.

Wir haben nun einige Versuche ausgeführt, um festzustellen, inwiefern die Nierenfunktion durch einen durch Injektion von Terpentinöl oder Pankreasgewebe hervorgerufenen peritonealen Reiz beeinflußt wird, und zwar haben wir uns nicht damit begnügt, die Harnmenge zu messen, sondern haben auch die Stickstoff- und Kochsalzausscheidung verfolgt. Wie sehr unsere Annahme, daß die Beobachtung der Harnmenge allein kein ausreichendes Urteil über eine sich etwa einstellende Alteration der Nierentätigkeit gestatten würde, berechtigt war, hat sich im Laufe unserer Untersuchungen gezeigt.

Der Tagesharn unserer Versuchshunde wurde in 3 gesonderten Anteilen (8^h früh bis 4^h nachm., 4^h nachm. bis 10 oder 12^h nachts, 10 oder 12^h nachts bis 8^h früh) den nach Falks Methode operierten weiblichen Hunden mit dem Katheter entnommen und analysiert. Es wurde nur einmal des Tages, und zwar um 10 bzw. 12^h abends gefüttert. Es brachte dies den Vorteil mit sich, daß, falls nach der intraperitonealen Injektion Würgbewegungen eintraten, der Magen bereits leer war und eine Verunreinigung des Harnes durch Mageninhalt demnach nicht zu befürchten war.

Der Harnstickstoff wurde nach Kjeldahl, die Chloridausscheidung nach Volhard nach Vorbehandlung des Harnes in der von Mering[1]) für Hundeharn angegebenen Weise (Erwärmen mit Zinkstaub unter Zusatz von Schwefelsäure am Wasserbade) vorgenommen.

1. Versuch.

Hündin, 7300 g schwer, wurde nur einmal täglich, und zwar um 12^h nachts mit 400 g rohen, gehackten Fleisches gefüttert. Erhielt am 27. V. um 8^h früh 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal, um 2$^1/_2{}^h$ 4 mg Adrenalin subcutan. Es gelang in diesem Falle nicht, die Glucosurie hintanzuhalten.

Harnmenge:

Harn gesammelt am	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
um					
8^h früh		177	153	129	
				Inj. von Terpentin	418
4^h nachm.		136	149	87	
12^h nachts	62	48	40	92	
		331	342	308	

[1]) Mering, Zeitschr. f. physiol. Chemie 8, 232.

N-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
8h früh		5,63	5,87	6,19	
				Inj. von Terpentin	11,70
4h nachm.		5,46	5,48	2,45	
12h nachts	1,63	1,48	1,92	2,49	
		12,57	13,27	11,13	

NaCl-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
8h früh		0,1376	0,1224	0,0903	
				Inj. von Terpentin	0,3026
4h nachm.		0,3296	0,2011	0,0435	
12h nachts	0,1346	0,0984	0,0260	0,0368	
		0,5656	0,3495	0,1706	

Die Betrachtung unserer Versuchszahlen ergibt, daß die Terpentininjektion ein temporäres Absinken der Harnmenge, der N- und der NaCl-Ausscheidung bewirkt hatte; dasselbe ist hinsichtlich der Harnmenge am wenigsten, hinsichtlich der Kochsalzausscheidung am deutlichsten ausgeprägt. Zieht man die um 8h früh und 4h nachm. gesammelten Harnmengen zusammen, so ergibt sich für den Vortag der Injektion eine NaCl-Ausscheidung von 0,3235, für den Tag nach der Injektion 0,3026, also etwa der gleiche Wert, für den Tag der Injektion selbst aber nur 0,1338, also weniger als die Hälfte. Die N-Ausscheidung zeigt ein ähnliches Verhalten.

Das Verhalten der NaCl-Ausscheidung wurde noch deutlicher, als wir der Nahrung Kochsalz zusetzten.

2. Versuch.

Der Hund vom Versuch 1 wurde täglich um 10h abends mit 400 g Fleich unter Zulage von 1 g Kochsalz gefüttert. Am 9. VI. um 8h früh intraperitoneale Injektion von 2 ccm Terpentinöl, um 11¾h subcutane Injektion von 3½ mg Suprarenin. Der später gesammelte Harn war zuckerfrei.

Harnmenge:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8h früh	143	147	160	130
				Inj. von Terpentin
4h nachm.	90	87	117	60
10h abends	50	55	57	56
	283	289	334	246

N-Ausscheidung:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8h früh	7,69	7,77	7,46	7,34
				Inj. von Terpentin
4h nachm.	?	3,58	4,80	1,95
10h abends	2,22	1,94	2,31	2,22
		13,29	14,57	11,51

NaCl-Ausscheidung:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8h früh	0,5870	0,8673	0,5120	0,5525
				Inj. von Terpentin
4h nachm.	0,6030	0,5046	0,6787	0,0780
11h abends	0,2475	0,1677	0,2109	0,0812
	1,4375	1,5396	1,4016	0,7117

In diesem Falle war der Effekt der Terpentininjektion ein außerordentlich eklatanter: wir finden in der nach der Injektion gesammelten Harnportion weniger als die Hälfte des N und weniger als $^1/_8$ des NaCl, wie in der analogen Harnportion des Vortages.

Zwei weitere Versuche analoger Art wurden mit der Injektion von Pankreas ausgeführt.

3. Versuch.

Hund erhält nach 3tägiger Vorperiode, wobei er regelmäßig um 10h nachts ebenso wie der Hund im 2. Versuche gefüttert wird, am 23. VI. 1910 um $9^1/_4$h früh 5 g Pankreas intraperitoneal, sodann um $12^1/_4$h mittags $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Der in der ersten Periode entleerte Harn ist zuckerfrei; in den beiden nächsten Perioden (4h nachm. bis 8h früh) sistiert die Harnsekretion gänzlich. Da der Hund am selben Abend die Nahrung verweigert, muß der Versuch abgebrochen werden.

Harnmenge:

Harn gesammelt am um	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
8h früh	117	119	121	→ B 161	∅
				Injektion + v. Pankreas	
4h nachm.	46	79	72	108	
12h nachts	45	46	A	∅	
	208	244			

N-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
8h früh	4,43	4,74	5,13	→B 10,07	∅
				+ Injektion v. Pankreas	
4h nachm.	1,91	2,49	2,58	2,03	
12h nachts	1,06	0,38	A	∅	
	7,40	7,61			

NaCl-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
8h früh	0,3920	0,5340	0,780	→B 0,9528	∅
				+ Injektion v. Pankreas	
4h nachm.	0,4117	0,5372	0,3360	0,2484	
12h nachts	0,0902	0,0759	A	∅	
	0,8939	1,1471			

Obiger Versuch ist recht instruktiv. Wir vermissen hier nach Pankreasinjektion und darauffolgender Suprarenininjektion zunächst jede Verminderung in der Menge der Harnflüssigkeit; auch die Menge des ausgeschiedenen Stickstoffes ist nicht vermindert. Dennoch ist die Suprareninglucosurie ausgeblieben, und gleichzeitig macht sich auch ein merkliches Zurückgehen der NaCl-Ausscheidung bemerkbar. Wie sehr aber die Nierenfunktion gelitten hat, geht schon daraus hervor, daß einige Stunden nach der Pankreassekretion die Harnbildung gänzlich sistiert, derart, daß über 16 Stunden lang Anurie besteht.

Auch in dem folgenden Versuche tritt die Erscheinung zutage, daß die Fähigkeit der Niere, Kochsalz zu eliminieren, erheblich gelitten haben kann, ohne daß eine Verminderung der ausgeschiedenen Flüssigkeitsmenge bemerkbar wäre.

4. Versuch.

Derselbe Hund, der zu den beiden vorbeschriebenen Terpentinversuchen gedient hatte, wurde wiederum täglich einmal um 12h nachts mit 400 g rohen gehackten Fleisches unter Zugabe von 1 g Kochsalz gefüttert. Am 8. VII. um 9h vormittags erhielt er 5 g Pankreas subcutan und um 2h $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Der später ausgeschiedene Harn war zuckerfrei.

Harnmenge:				
Harn gesammelt am	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
um				
8h früh	104	183	128	132
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	87	105	95	96
10h abends	38	44	38	45
	229	332	261	273

N-Ausscheidung:				
Harn gesammelt am	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
um				
8h früh	8,25	6,52	6,70	6,98
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	5,34	7,06	7,02	4,28
10h abends	1,47	2,22	1,72	1,94
	15,06	15,80	15,44	13,20

NaCl-Ausscheidung:				
Harn gesammelt am	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
um				
8h früh	0,692	0,314	0,563	0,488
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	0,809	0,630	0,622	0,278
10h abends	0,253	0,320	0,285	0,042
	1,754	1,264	1,470	0,808

Wir legten uns nunmehr die Frage vor, ob eine heftige peritoneale Reizung auch unabhängig von dem Schmerzeffekte, nämlich am enthirnten bzw. narkotisierten Tiere, einen unmittelbaren Effekt im Sinne einer reflektorischen Hemmung der Diurese geltend macht.

5. Versuch.

Katze von $2^1/_2$ kg, enthirnt, künstliche Atmung. Der Harn wird aus einer Blasenkanüle aufgefangen und seine Entleerung mit Hilfe eines elektrischen Tropfenzählers registriert. Eine Salz-Diurese wurde [den Angaben von Magnus entsprechend] durch intravenöse Infusion einer 7 bis 8%igen Natriumsulfatlösung eingeleitet, und zwar ließen wir, um eine ganz gleichmäßige Infusion zu erzielen, nach dem Vorgange von Straub und Kretschmer[1]) die Salzlösung unter Druck durch eine Capillarröhre hindurch in die Vene einströmen (1,6 ccm pro Min.). Wir erzielten so eine recht gleichmäßige Diurese im Laufe von $^3/_4$ Stunden (4 bis 6 Tropfen pro Minute), die keine auffällige Veränderung erfuhr, als wir 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal injiziert hatten.

[1]) Kretschmer, Dauernde Blutdrucksteigerung durch Adrenalin. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, 423, 1907.

6. Versuch.

Analoger Versuch an einer 3 kg schweren, in Morphin-Äthernarkose befindlichen Katze. Infusion von 1 ccm Na_2SO_4 7,8% pro Minute. Lebhafte Diurese (40 bis 60 Tropfen in der Minute), die auch durch intraperitoneale Injektion von 5 ccm Trichloressigsäure 10%, sowie von 5 ccm konzentrierten Ammoniaks keine Einschränkung erfuhr.

Von einem etwa durch einen Krampf der Nierengefäße hervorgerufenen reflektorischen Stillstande der künstlich vermehrten Diurese ist hier also sicherlich keine Rede.

Wir haben nun aber weiterhin, um sowohl den Einfluß der Narkose als auch den einer künstlichen Diurese auszuschalten und um unsere Versuchstiere unter möglichst normalen physiologischen Bedingungen beobachten zu können, Hunden eine permanente Blasenfistel angelegt und dieselben einige Tage später in einem Gestelle, wie es Pawlow zur Fixierung seiner Magenfistelhunde anwendet, aufgestellt und so beobachtet, wobei der Harn in einem kleinen Meßzylinder aufgefangen wurde.

7. Versuch.

Mittelgroßer Hund, seit 1 Tag hungernd. Blasenfistel 3 Tage vorher angelegt. Hund wird um 11^h in das Pawlowsche Gestell gebracht. Die in 10 Minuten abgesonderte Harnmenge betrug: $11^h\,12'$ bis $11^h\,42'$: 1,7 ccm; $11^h\,42'$ bis $11^h\,57'$: 1,3 ccm; $11^h\,57'$ bis $12^h\,50'$: 1,1 ccm; $12^h\,50'$ bis $1^h\,10'$: 1,1 ccm; $1^h\,10'$ bis $2^h\,15'$: 1,1 ccm; $2^h\,15'$ bis $2^h\,55'$: 1,1 ccm; $2^h\,55'$ bis $3^h\,10'$: 1,2 ccm. Nunmehr wurde 1 ccm Terpentinöl injiziert. Es stellten sich heftige Schmerzensäußerungen nebst Würgen und Erbrechen ein, die später einer Apathie Platz machten. Die Harnabsonderung betrug $3^h\,17'$ bis $3^h\,27'$: 1,1 ccm; $3^h\,27'$ bis $3^h\,37'$: 4,4 ccm; $3^h\,37'$ bis $3^h\,47'$: 1,5 ccm; $3^h\,47'$ bis $3^h\,57'$: 1,6 ccm; $3^h\,57'$ bis $5^h\,17'$: 0,7 bis 1,1 ccm; $5^h\,17'$ bis $6^h\,27'$: 0,8 bis 1,0 ccm.

8. Versuch.

Der Versuch wird an demselben Hunde einige Tage später wiederholt. Derselbe wird um $10^h\,30'$ in das Pawlowsche Gestell gebracht. Die Harnabsonderung beträgt $10^h\,50'$ bis $11^h\,14'$: 1,6 ccm; $11^h\,14'$ bis 1^h: 1,2 bis 1,3 ccm in 10 Minuten. Nunmehr um $1^h\,4'$ intraperitoneale Injektion von 1 ccm Terpentinöl: $1^h\,4'$ bis $2^h\,2'$: 1,1 ccm Harn in 10 Minuten; $2^h\,2'$ bis $3^h\,41'$: 1,1 ccm; $3^h\,41'$ bis $6^h\,24'$: 0,8 ccm; $6^h\,24'$ bis $8^h\,23'$: 0,7 ccm. (Der Hund stirbt in der folgenden Nacht.)

Sonach war auch unter möglichst normalen Verhältnissen von einer ausgiebigen Verminderung der Harnmenge durch den heftigen peritonealen Reiz nichts zu merken.

Nun hatten uns aber unsere oben mitgeteilten Versuche darüber belehrt, daß die Sekretionstätigkeit der Niere in bezug auf die Ausscheidung der gelösten Harnbestandteile eine weitgehende Alteration erfahren kann, ohne daß das Wasserausscheidungsvermögen deswegen eine auffallende Änderung zeigen müßte.

Wir haben daher an einem Blasenfistelhunde einen Versuch in der Art ausgeführt, daß nicht nur die Menge der Harnflüssigkeit gemessen, sondern auch der Kochsalzgehalt der einzelnen Harnportionen bestimmt wurde.

9. Versuch.

Ein Vorversuch ergibt zunächst, daß die Kochsalzausscheidung bei einem hungernden Blasenfistelhunde ausreichend gleichmäßig ist:

I. Periode in der Dauer von 1h 28′: Harnmenge 17,3 ccm. In 10 ccm Harn: 0,075 g Kochsalz.

II. Periode in der Dauer von 1h 53′: Harnmenge 17,0 ccm. In 10 ccm Harn: 0,089 g Kochsalz.

III. Periode in der Dauer von 1h 36′: Harnmenge 12,0 ccm. In 10 ccm Harn: 0,084 g Kochsalz.

Einige Tage später wurde der im Hungerzustande befindliche Hund neuerlich in das Gestell gebracht und die Wirkung einer Terpentin-Injektion in das Peritoneum beobachtet. (Dieselbe war unmittelbar von Schmerzensäußerungen, 3maligem Erbrechen, Abgang von Kot und Speichelsekretion begleitet.)

	Abgesond. Harnmenge in 10 Minuten	In 10 ccm Harn enthaltene NaCl-Menge	Im Laufe 1 Stunde wurden abgesondert:	
		NaCl	Wasser	Kochsalz
I. Periode 10h 5′ bis 11h 27′	Mittel: 2,0 ccm	0,121 g	12,2 ccm	+ 0,148 g
II. Periode 11h 27′ bis 12h 45′	1,7 „	0,136 g	10,3 „	+ 0,140 g
Terpentin-Injektion 1h 19′				
III. Periode 1h 19′ bis 3h 02′	1,3 „	0,052 g	7,6 „	+ 0,040 g
IV. Periode 3h 02′ bis 4h 42′	1,4 „	0,063 g	8,3 „	+ 0,052 g

Es tritt sonach auch hier wiederum dieselbe Erscheinung zutage, die wir bereits bei unseren früheren Versuchen beobachtet haben: Während die Menge des abgesonderten Harnwassers nur eine wenig auffallende Verminderung erfahren hatte, hat die Kochsalzausscheidung eine außerordentlich starke Einbuße erlitten, derart, daß auf der Höhe der Wirkung des peritonealen Reizes

weniger als $^1/_3$ des früheren Quantums in der Zeiteinheit eliminiert wurde.

Diese Beobachtung gibt uns nun auch den Schlüssel zum Verständnisse der Tatsache, wieso ein peritonealer Reiz, sei er nun durch die Injektion von Pankreasgewebe, von Terpentin, Aleuronat usw. bedingt, befähigt ist, die Suprareninglucosurie zu hemmen: Was für das Kochsalz gilt, wird sicherlich in noch höherem Grade für den Zucker gelten, der ja unter normalen Verhältnissen von der Niere zurückgehalten wird und erst dann, wenn der Blutzucker ein gewisses Niveau übersteigt, die Nierenepithelien zu durchdringen vermag. Ebenso wie die Niere unter dem Einflusse des peritonealen Reizes dem Kochsalze gegenüber in ihrer Leistung versagt, versagt sie eben auch dem Zucker gegenüber, derart, daß sie auf ein Blutzuckerniveau, das unter normalen Verhältnissen zu Glucosurie führt, jetzt nicht mehr mit Zuckerausscheidung reagiert.

Falls diese Auffassung richtig ist, bleibt also die Suprareninglucosurie nach intraperitonealer Pankreasinjektion infolge der verminderten Nierenleistung aus, trotzdem die Ausschüttung in Form von Glykogen in der Leber aufgestapelten Zuckers in normaler Weise erfolgt und das Blutzuckerniveau über die Norm gestiegen ist. Wir haben uns nun auch noch von der letztgenannten Tatsache überzeugt, um die Beweiskette zu schließen.

9. Versuch.

Um zunächst festzustellen, in welchem Umfange das Blutzuckerniveau eines Hundes auf eine an sich kleine Suprarenindosis, wie sie bei unseren Versuchen in Betracht kommt, reagiert, wurden einem 10 kg schweren Hunde 10 ccm Blut aus einem Einschnitte in das Ohr entnommen und in 3 ccm einer (frisch in einem Platintiegel bereiteten!) 4%igen Natriumfluoridlösung aufgefangen. Die Blutzuckerbestimmung wurde nach dem Schenckschen Verfahren durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, daß wir die Titration des Zuckers nach Bertrand vornehmen. Es fand sich so ein Blutzuckergehalt von 0,108%.

Eine Woche später erhielt derselbe Hund 5 mg Suprarenin subcutan, worauf er mit reichlicher Zuckerausscheidung reagierte. In einer $3^1/_4$ Stunden nach der Injektion entnommenen Blutprobe fand sich nunmehr 0,165% Zucker. Die Erhöhung des Blutzuckerniveaus ist hier nicht sehr hochgradig, offenbar deswegen, weil die Zuckerausschüttung nicht sehr schnell erfolgt.

Wir haben nun einem anderen Hunde von gleichem Gewichte 12 ccm Blut aus dem Ohre entnommen und darin 0,081% Zucker gefunden.

6 Tage später erhielt der Hund um 11^h vorm. 6 g steriles Pankreas vom Rinde intraperitoneal injiziert, um 4^h nachm. 5 mg Suprarenin subcutan; um $7^1/_2{}^h$ abends wurden ihm 10 ccm Blut entnommen. Es fand sich darin ein Zuckergehalt von 0,14%.

Eine merkliche Erhöhung des Blutzuckerniveaus hatte sich hier also eingestellt, trotzdem der am nächsten Tage gesammelte Harn sich zuckerfrei erwies.

IV. Schlußfolgerungen.

Wir gelangen sonach zu dem Schlußergebnisse, daß das Ausbleiben der Suprareninglucosurie nach intraperitonealer Injektion von Pankreaspräparaten durch eine infolge des peritotonealen Reizes sich einstellende Alteration der Nierenfunktion hinreichend erklärt ist und daß diese Erscheinung keineswegs die Annahme eines geheimnisvollen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere erfordert.

Diese Erklärung ist nicht ohne weiteres auf jene Versuche Zuelzers und seiner Nachfolger anwendbar, bei denen die Pankreaspräparate nicht intraperitoneal, sondern subcutan bzw. intravenös beigebracht wurden.

Man wird jedoch bei Beurteilung dieser Versuche immerhin alles das in Betracht ziehen müssen, was wir über die hochgradige Toxizität der Pankreaspräparate bei jeder Applikationsform wissen.[1])

Wir erinnern z. B. daran, daß Achalme nach subcutaner Injektion von Pankreatinlösungen bei Meerschweinchen ausgedehnte Nekrosen erhielt und daß v. Bergmann Hunde, denen er ohne entsprechende Vorbehandlung das ganze Pankreas eines fremden Individuums implantiert hatte, stets nach längstens 20 Stunden zugrunde gehen sah. Wir weisen ferner darauf hin, daß auch Zuelzer[2]) jene Menschen, denen er seine durch Vorbehandlung teilweise entgifteten Pankreaspräparate intravenös beigebracht hatte, darauf vielfach mit Schüttelfrost, mehrtägigem Fieber und schlechtem Befinden reagieren sah.

---

[1]) Vgl. die Literaturangaben in unserer Arbeit. Diese Zeitschr. 20, 385.
[2]) l. c.

Wir erinnern weiterhin an die oben zitierten Beobachtungen, aus denen zur Genüge hervorgeht, daß Schädlichkeiten der verschiedensten Art (wie Fieber, Nierenschädigung und Diuresenhemmung, Pepton, Hirudin und andere Lymphagoga) die Suprareninglucosurie zu hemmen vermögen.[1]) Es liegt wohl auf der Hand, daß Schädlichkeiten ähnlicher Art sehr wohl auch bei der subcutanen und intravenösen Applikation von Pankreaspräparaten eine gewichtige Rolle spielen können; jedenfalls sind eingehende und sorgfältige Untersuchungen erforderlich, um die Fehlerquellen dieser Art mit Sicherheit auszuschließen.

Ohne also dem Ergebnisse derartiger Untersuchungen in dem einen oder anderen Sinne vorgreifen zu wollen, halten wir vorläufig den Beweis für einen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere durch die vorliegenden Beobachtungen über Hemmung der Suprareninglucosurie durch Injektion von Pankreaspräparaten keinesfalls für erbracht.

Daß der Einfluß des lebenden Pankreas auf den Kohlenhydratstoffwechsel, der zu den bestfundierten Tatsachen der Physiologie gehört, durch unsere Feststellungen nicht tangiert wird, bedarf wohl kaum einer Erwähnung. Nicht um diese Frage handelt es sich, sondern um die Frage, ob es möglich sei, die mächtige Wirkung, die das Pankreas zweifellos auf den Kohlenhydratstoffwechsel im lebenden Organismus ausübt, sozusagen an das Reagensglas zu bannen und auf präparatorischem Wege wirksame „Pankreashormone" zu bereiten — und in dieser Hinsicht scheinen uns allerdings Zweifel sehr am Platze zu sein.

Zum Schlusse möchten wir noch darauf hinweisen, daß man fortan bei jeder die Zuckerausscheidung betreffenden Untersuchung mit der Tatsache zu rechnen haben wird, daß Schädlichkeiten und Eingriffe, welche die Ausscheidung des Harnwassers nicht einmal merklich zu beeinflussen brauchen,

---

[1]) Vgl. diesbezüglich den Artikel von Morawitz über Kochsalzsekretion im Fieber in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 4, 2. Teil, S. 287 ff, sowie auch die Angaben von v. Noorden über den vermindernden Einfluß mancher interkurrenter Krankheiten, insbesondere von Nierenaffektionen auf die Zuckerausscheidung beim Diabetes im Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden, 2, 67, 1907.

dennoch die Nierenfunktion im Sinne einer Hemmung der Zuckerelimination verändern und schwerwiegende Täuschungen in bezug auf die Vorgänge des Kohlenhydratstoffwechsels herbeiführen können. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen, gerade aus den letzten Jahren, die den Einfluß verschiedener Organe sowie toxikologischer und operativer Eingriffe auf die Bildung und den Verbrauch des Zuckers zum Gegenstande haben, bedürfen von diesem Gesichtspunkte aus einer Revision.

Zusammenfassung.

1. Die Beobachtungen Zuelzers u. a. über die Hemmung der Suprareninglucosurie durch Injektion von Pankreasgewebe werden bestätigt. Es ergibt sich, daß diese Hemmung auch nach ausgiebiger immunisatorischer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Trypsin- bzw. Pankreaspräparaten prompt erfolgt.

2. Eine analoge Hemmung der Suprareninglucosurie kann auch erzielt werden, wenn man, anstatt Pankreasgewebe intraperitoneal zu injizieren, einen peritonealen Reizzustand durch Injektion von Terpentinöl oder Aleuronat herbeiführt.

3. Ein derartiger peritonealer Reizzustand vermag, ohne daß die Ausscheidung der Harnflüssigkeit als solche dabei eine auffallende Verminderung erfahren müßte, die Sekretionstätigkeit der Niere derart zu beeinflussen, daß die Ausscheidung der gelösten Harnbestandteile erheblich abnimmt. Eine solche von der Menge des Harnwassers unabhängige Abnahme konnte sowohl für den Stickstoff als auch besonders für die Chloride des Harnes direkt festgestellt werden.

4. Die Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Injektionen von Pankreasgewebe findet durch eine derartige Alteration der sekretorischen Nierentätigkeit eine ausreichende Erklärung, ohne daß die Annahme eines Antagonismus spezifischer, den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussender Pankreas- und Nebennierenhormone herangezogen werden müßte.

5. Die Annahme, daß die Hemmung der Suprareninglucosurie durch subcutane Injektionen von Pankreaspräparaten auf einen derartigen Antagonismus zurückzuführen ist, setzt

die bisher mangelnde Beweisführung voraus, daß keine der Schädlichkeiten, die angesichts der hochgradigen Toxizität der Pankreaspräparate hier in Betracht kommen (wie z. B. Fieber, Alterationen der Nierentätigkeit) für die in Rede stehende Erscheinung eine ausreichende Erklärung bietet.

6. Die Nichtbeachtung der Tatsache, daß die verschiedensten Schädlichkeiten und Eingriffe, welche die Ausscheidung des Harnwassers nicht einmal merklich zu beeinflussen brauchen, dennoch die Nierenfunktion im Sinne einer Hemmung der Zuckerelimination weitgehend zu verändern vermögen, kann bei experimentellen Arbeiten, die den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Kohlenhydratstoffwechsel betreffen, zu groben Täuschungen Anlaß geben.

Zur Kenntnis der Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren.

Von

K. Kawashima (Tokio).

(Aus der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 18. Januar 1911.)

In einer früher erschienenen Arbeit hat von Poggenpohl[1]) über Untersuchungen berichtet, die einige die Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren betreffende Fragen zum Gegenstand hatten. Es hatte sich gezeigt, daß zwischen den von Kaninchen und von Ziegen stammenden Amboceptoren, die durch Vorbehandlung mit derselben Blutart entstanden sind, charakteristische Differenzen bestehen. Von den von der Ziege stammenden Amboceptoren wird offenbar stets nur ungefähr eine lösende Dosis von den Blutkörperchen gebunden, auch wenn ihnen ein erhebliches Multiplum derselben dargeboten wird. Auf der anderen Seite binden die Blutkörperchen eine wechselnde Zahl von Einheiten der vom Kaninchen stammenden Amboceptoren, in jedem Fall eine größere Anzahl derselben. Beide Typen der Bindungsweise waren bereits aus den früheren Mitteilungen über Hämolysine von Ehrlich und Morgenroth[2]) bekannt. Jedoch erst jetzt konnte die Annahme ausgesprochen werden, daß diese verschiedene Art der Bindung nicht von der Art der bindenden Blutkörperchen, sondern von der Spezies des die Amboceptoren liefernden Tieres abhängig und für diese bezeichnend sei.

---

[1]) Poggenpohl, diese Zeitschr. 22, 1909.

[2]) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 21 und 22.

Aus technischen Gründen wurden bisher meist Kaninchen, seltener Ziegen, zur Gewinnung der hämolytischen Amboceptoren benutzt, und deshalb liegen in dieser Hinsicht über die Amboceptoren anderer Tiergattungen nur geringe Materialien vor. Vor allem fehlt es an Angaben, welchem der beiden hier genannten Typen sich die Amboceptoren anderer Tierspezies anschließen.

Eine Ausfüllung dieser Lücke erscheint wünschenswert, und ich habe deshalb das Verhalten einiger vom Hunde stammenden Amboceptoren untersucht.

Das Serum der zur Gewinnung der Amboceptoren dienenden beiden Hunde wurde zunächst vor der Immunisierung untersucht, und zwar zuerst im aktiven Zustande und dann nach der Inaktivierung durch halbstündiges Erwärmen auf 56°. Es zeigte sich, daß es in aktivem Zustande auf Ziegenblut die bekannte, ziemlich starke hämolytische Wirkung ausübt, daß es aber, einmal inaktiviert, durch Meerschweinchenserum in der üblichen Weise nicht reaktiviert werden kann. Wir geben unten die Versuche wieder, zu denen je 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von 2mal mit Kochsalzlösung gewaschenem Ziegenblut verwendet wurde; als Komplement diente 1 ccm frischen Meerschweinchenserums.

Menge des normalen Hundeserums ccm	Hund I		Hund II	
	aktiv	inaktiv + Komplement	aktiv	inaktiv + Komplement
0,5	komplett	wenig	komplett	sehr wenig
0,3	"	"	"	" "
0,2	"	"	"	" "
0,1	fast komplett	Spur	Schleier	" Spur
$0,5^1/_{10}$	wenig	"	stark	Spürchen
$0,25^1/_{10}$	Spur	Spürchen	Spürchen	minimal Spürchen
$0,1^1/_{10}$	0	0	0	0
0 (Kompl. allein)	0		0	
0	0		0	

Es geht aus diesem Versuch die für die Beurteilung der weiteren Ergebnisse als wesentlich in Betracht kommende Tatsache hervor, daß der im normalen Hundeserum vorhandene, auf Ziegenblut wirkende Amboceptor durch das Inaktivieren des Serums ausgeschaltet wird, also in den folgenden Versuchen nicht in Frage kommt.

Dem Hund I wurden am 29. IV. und 18. V. je 40 ccm Ziegenblut subcutan injiziert, am 31. V. nochmals 27 ccm, am 6. VI. wurde er entblutet. Hund II erhielt auch subcutan am 5. VII. 30 ccm und am 12. VII. 45 ccm Ziegenblut, am 19. VII. wurde er entblutet. Die komplett lösende Dosis des Amboceptors von Hund I für 1 ccm 5%iges Ziegenblut, bei Anwendung von 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement betrug 0,02. Bei Hund II 0,003 (später 0,004).

Der Bindungsversuch wurde in der Weise angestellt, daß zu 5 ccm der 5%igen Blutaufschwemmung wechselnde Mengen des Amboceptors zugesetzt wurden. Die Gemische wurden unter öfterem Schütteln 1 Stunde bei 37° im Brutschrank gehalten und hierauf das Sediment abzentrifugiert. Das Sediment wurde 2mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, hernach auf das ursprüngliche Volum aufgefüllt und zu je 1 ccm desselben 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt. Von dem Abguß wurden wechselnde Mengen zu 1 ccm 5%igen Ziegenblutes, zusammen mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt.

Die Mengen des zum ersten Versuch benutzten Serums des Hundes I sind aus untenstehender Tabelle zu entnehmen, ebenso das Resultat der Untersuchung des Abgusses. Das Sediment wurde in allen Fällen nach Komplementzusatz vollständig gelöst.

	Menge des 5%igen Ziegenblutes		Menge des Ziegen-Hunde-Amboceptors		Menge der physiol. NaCl-Lösung		Zahl der lösenden Dosen
	ccm		ccm		ccm		
1.	5,0	+	0,5	+	0,5	d. h.	5 f.
2.	5,0	+	0,6	+	0,4		6 f.
3.	5,0	+	0,7	+	0,3		7 f.
4.	5,0	+	1,0	+	0		10 f.

Menge des Abgusses ccm	Ursprüngl. lösende Dosis			
	5 f.	6 f.	7 f.	10 f.
1,0	Spürchen	wenig	wenig	wenig
0,5	minimal Spürchen	Spürchen	Spürchen	Spürchen
0	0	—	—	—
0 (Blut allein)	0	—	—	—

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß die Blutkörperchen von diesem Amboceptor mindestens das 10fache der lösenden Dosis zu binden vermögen.

Ein zweiter Versuch mit dem Amboceptor des Hundes II, der unter denselben Bedingungen ausgeführt wurde, ergab ein

Resultat, das mit dem eben geschilderten in Einklang stand. Es wurden nur 2 ccm 5%igen Ziegenblutes verwendet, die dann auf 3 ccm aufgefüllt wurden. Zu 1,5 ccm des Abgusses wurden 1 ccm frischen 5%igen Ziegenblutes und 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugesetzt. 1 ccm 2mal gewaschenen Sediments wurde bei Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenserum vollständig gelöst. Das Verhalten des Abgusses ergibt sich aus folgender Zusammenstellung:

Zahl der lösenden Dosen	Abguß
10 f.	stark
11 f.	Schleier
12 f.	komplett
13 f.	„
14 f.	„
15 f.	„

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß hier das 10fache der lösenden Dosis nicht mehr vollständig gebunden wird.

Es scheint also, daß sich der vom Hunde stammende, auf Ziegenblut wirkende Amboceptor dem Typus der vom Kaninchen stammenden Amboceptoren anschließt. Das Verhalten der gebundenen Amboceptoren (vom Kaninchen stammend) nach Zufügen neuer Blutkörperchen wurde in Anschluß an Morgenroths[1]) frühere Versuche von Philosophow[2]) eingehender untersucht. Nachdem auch für Hundeamboceptoren die Bindung eines Multiplums der Amboceptoreinheit festgestellt war, war die Möglichkeit gegeben, auch diesen Versuch auszuführen und so zu einer Vorstellung von der Festigkeit der Amboceptorbindung in diesem Falle zu gelangen.

Zu je 5 ccm des 5%igen Ziegenblutes wurden wechselnde Mengen des Amboceptors zugefügt (durch Kochsalzlösungzusatz betrug das Gesamtvolum 6 ccm). Nach 1stündigem Verweilen bei 37° wurde abzentrifugiert, 2mal mit Kochsalzlösung gewaschen und wieder auf das ursprüngliche Volum von 5 ccm aufgefüllt. Die Bindung wurde in der Weise geprüft, daß zu 1,2 ccm des Abgusses 1 ccm 5%igen Blutes und 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt wurde. Zu je 1 ccm des gewaschenen

[1]) Morgenroth, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.

[2]) Philosophow, diese Zeitschr. 20, 1909.

Sediments wurde dann von neuem 1,0 ccm frischen Blutes zugesetzt, und nachdem diese Gemische 30 resp. 60 Minuten im Wasserbade bei 40° verweilt hatten, 0,2 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugefügt. Aus der Untersuchung des Abgusses ist zu ersehen, daß jedesmal der größte Teil des zugefügten Amboceptors, in prinzipieller Übereinstimmung mit dem oben geschilderten Versuch, der wie der hier beschriebene mit Hundeserum I angestellt wurde, gebunden wird. Das Resultat des Überspringungsversuchs ist gleichfalls in der untenstehenden Tabelle enthalten. Es zeigt sich, daß nach 30 Minuten der Prozeß im wesentlichen vollendet ist, und daß schon bei ursprünglicher Bindung von drei lösenden Dosen eine lösende Dosis an die neu zugefügten Blutkörperchen abgegeben wird. Eine mehrmalige Wiederholung des Versuchs ergab das gleiche Resultat.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment (mit M. S. 0,2 ccm)		Abguß (mit M. S. 0,1 ccm)
	30 Min. bei 40°	60 Min. bei 40°	60 Min. bei 40°
2 f.	Schleier	fast ganz komplett	0
3 f.	komplett	komplett	minimal Spürchen
4 f.	„	„	Spürchen
5 f.	„	„	Kuppe
6 f.	„	„	mäßig
7 f.	„	„	stark

Kontrolle:

Frisches 5%iges Ziegenblut 1 ccm + NaCl-Lös. 1,0 + M. S. 0,1 = 0
„ „ „ 1 „ + „ 1,1 = 0

Mit derselben Versuchsanordnung wurde das Serum von Hund II geprüft. Die lösende Dosis für 1,0 ccm Blut betrug 0,004. Wie aus der untenstehenden Tabelle hervorgeht, wurden ursprünglich 6 lösende Dosen bis auf eine Spur gebunden, und von 3 lösenden Dosen geht wiederum eine auf die neu zugefügten Blutkörperchen über.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment (1^h bei 40°)	Abguß (1^h bei 40°)
1 f.	stark	0
2 f.	Schleier	Spürchen
3 f.	komplett	„
4 f.	„	Spur
5 f.	„	„
6 f.	„	„

Wir lassen das Resultat eines vergleichenden Versuches folgen, der gleichzeitig mit dem Amboceptor von Hund II (lösende Dosis $0{,}3^1/_{100}$) und dem Amboceptor eines mit Ziegenblut behandelten Kaninchens (lösende Dosis $0{,}6^1/_{1000}$) vorgenommen wurde. Der Übergang vollzog sich, wie in den früheren Versuchen, bei 40° in 1 Stunde. Kontrollversuche mit dem Abguß ergaben in beiden Fällen eine bis auf Spuren vollständige Bindung von 5 lösenden Dosen.

Wie aus der untenstehenden Tabelle zu ersehen ist, verhalten sich beide Amboceptoren, wie auch nach den vorausgehenden Versuchen zu erwarten war, im wesentlichen gleichartig; ein gewisser Unterschied, der mit früheren Erfahrungen an Kaninchenamboceptoren übereinstimmt, dokumentiert sich darin, daß bei diesen erst nach Bindung von 4 lösenden Dosen eine lösende Dosis an neue Blutkörperchen abgegeben wird, während dies beim Hundeamboceptor bei 2 bis 3 lösenden Dosen bereits der Fall ist.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment: Hunde-amboceptor	Sediment: Kaninchen-amboceptor
1 f.	Schleier	stark
2 f.	fast komplett	„
3 f.	komplett	fast komplett
4 f.	„	komplett
5 f.	„	„

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Morgenroth, die dann durch die Untersuchungen von Philosophow ergänzt wurden, konnten auch wir in unserem Fall eine Abhängigkeit des Überspringens der Amboceptoren von der Temperatur beobachten.

Dauer im Wasserbade (40°) oder im Eiswasser (0°)	6 fach sensibilisiertes Sediment	
	40°	0°
sofort	fast ganz kompl.	fast ganz kompl.
5′	komplett	„ „ „
15′	„	Schleier
25′	„	„
30′	„	„

Wie die Tabelle zeigt, ist bei 0° auch nach 30 Minuten ein vollständiger Übergang des Amboceptors noch nicht erfolgt, während bei 40° schon nach 5 Minuten eine lösende Dosis übergegangen ist. Der Vorgang vollzieht sich also bei niedriger Temperatur mit geringerer Geschwindigkeit.

Es geht also aus unseren Versuchen hervor, daß die beiden untersuchten Amboceptoren vom Hunde sich in ihren wesentlichen Bindungseigenschaften den vom Kaninchen stammenden, auf die gleiche Blutart (Ziegenblut) wirkenden Amboceptoren anschließen.

Studien über Antigenbildung in eiweißfreien Nährmedien.

I. Mitteilung.

Beiträge zur Kenntnis des Tuberkulins.

Von

Ernst Löwenstein und Ernst P. Pick.

(Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut in Wien.)

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

Die Stoffe, aus denen die Bakterienzelle ihre Leibesbestandteile aufbaut, sind vielfachen Studien unterworfen worden; die dabei gewonnenen Tatsachen bilden zum Teil die Grundlagen der modernen Bakteriologie. Während die Umsetzungen, welche hierbei die Hauptbestandteile der Nährmedien, die Eiweißkörper, Fette und Kohlenhydrate erfahren, in vielen Arbeiten näher charakterisiert worden sind, blieben unsere Kenntnisse über das für das Leben der Bakterien und das Entstehen ihrer Stoffwechselprodukte nötige Existenzminmum sehr bescheiden. Gerade das Wachstum auf den einfach zusammengesetzten Nährmedien bietet aber für die Aufklärung der Stoffwechselvorgänge die besten Bedingungen.

Der Grund, daß das Studium in dieser Richtung lange keine befriedigenden Erfolge ergeben hat, liegt darin, daß die verschiedenen Bakterien auf diesen einfachen Nährböden oft entweder gar nicht oder nur kümmerlich gedeihen, und dementsprechend die Bildung der bekannten giftigen Stoffwechselprodukte nur ein bescheidenes Maß erreicht oder völlig ausbleibt. Eine Reihe sehr wichtiger Versuche in dieser Richtung verdanken wir Kühne, Fermi, Uschinsky, C. Fraenkel, Proskauer und Beck, Carbone u. a.[1]). Seit dem Erscheinen

[1]) Siehe Kruse, Allgemeine Mikrobiologie; Vogel, 1910. Daselbst die einschlägige Literatur.

dieser älteren Arbeiten hat sich die Kenntnis der giftigen Stoffwechselprodukte wesentlich vermehrt und die Technik ihres Nachweises verfeinert; deshalb schien uns eine Wiederaufnahme dieser Arbeiten nicht aussichtslos.

Es ist von vornherein klar, daß für das Studium der Giftbildung in einfach zusammengesetzten Nährmedien nur diejenigen Bakterienprodukte sich eignen, die als Stoffwechselprodukte sensu strictiori aufzufassen sind und sich nicht ohne weiteres durch die Nährlösungen selbst aus den Bakterienleibern extrahieren lassen; wir kennen eine Reihe von giftigen und ungiftigen Bakterienantigenen, die durch physiologische Kochsalzlösung, verdünnte Alkalien oder Säuren leicht zu extrahieren sind und nichts anderes darstellen, als in Lösung gegangene Leibesbestandteile. Diese künstliche Extraktion ist vielfach in ihrem Endeffekt gleichzusetzen den in jeder gewachsenen Kultur spontan sich abspielenden Prozessen, durch welche größere oder geringere Mengen der Leibessubstanz in Lösung gehen, abgesehen von den als Autolyse bezeichneten Zerfallsprozessen, durch die ebenfalls eine Reihe von chemisch und pharmakologisch verschiedenwertigen Produkten in der Nährflüssigkeit entstehen.

Für das Studium giftiger, antigen wirkender Stoffwechselprodukte ist es daher von kardinaler Bedeutung, daß nur solche Antigene für die Lösung dieser Frage herangezogen werden, bei denen der eben erörterte Entstehungsmodus ausgeschlossen ist. Wissen wir doch, daß Antigene für Agglutinine, Präcipitine, Hämolysine und gewisse toxisch wirkende Antigene aus Cholera-, Typhus-, Coli-, Dysenteriebakterien sich ebenso leicht durch kurze Extraktion junger Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung gewinnen lassen, wie aus den Tonfiltraten alter Kulturen. Die durch Extraktion gewonnenen Antigene sind vielfach sehr eiweißarm, ja manchmal lassen sich Antigene isolieren, die keine Eiweißreaktion aufweisen [E. P. Pick[1])]. Alle derartigen Produkte sind jedoch für das Studium der vorliegenden Frage ungeeignet.

Die größtmöglichen Garantien für das Studium der natürlichen Antigenbildung sind dann gegeben, wenn in Medien bekannter Zusammensetzung Bakterien gezüchtet werden, welche

[1]) E. P. Pick, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1.

keine Extraktstoffe abgeben, sondern nur spezifische Stoffwechselprodukte, die an das Leben und Wachstum dieser Bakterien geknüpft sind. Diese Voraussetzung schien uns am besten bei dem Tuberkelbacillus zuzutreffen; deshalb haben wir für unsere Versuche die Züchtung des Tuberkelbacillus auf eiweißfreien Nährböden gewählt.

I. Versuche über die Extrahierbarkeit des Tuberkulins aus den Bacillenleibern.

Obwohl aus zahlreichen Versuchen[1]) mit großer Wahrscheinlichkeit hervorgeht, daß durch einfache Extraktion aus den Tuberkelbacillenleibern Stoffe vom Giftcharakter des Alttuberkulins nicht dargestellt werden können, so war es im Hinblicke auf die eingangs aufgeworfene Frage für uns von großer Wichtigkeit, mit Sicherheit den Nachweis führen zu können, daß derartige Körper durch die von uns verwendete Nährlösung aus den Bakterien nicht extrahierbar sind, sondern echte Stoffwechselprodukte derselben darstellen. Zu diesem Behufe wurden 2,7 g auf Bouillon-Glycerin gezüchteter, durch Sterilisation im Dampfe abgetöteter und zwischen Filtrierpapier gut abgepreßter Tuberkelbacillen in 100 ccm der später zu beschreibenden Asparaginnährlösung aufgeschwemmt und 2 Stunden im Kolben auf dem Wasserbade gekocht, nachdem vielfache eigene wie fremde Versuche ergeben hatten, daß die Tuberkulinwirkung selbst durch länger währende Hitze strömenden Dampfes nicht nennenswert beeinflußt wird. Das hierauf durch Papierfiltration von den Bakterienleibern getrennte, nahezu klare Filtrat wurde nach Entnahme einer ca. 4 ccm fassenden Probe (Lösung a) in einer Schale auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft und der Rückstand in 13 ccm Wasser aufgenommen (Lösung b). Die Prüfung der beiden Flüssigkeiten auf Tuberkulinwirkung wurde mittels der intracutanen Methode an tuberkulösen Meerschweinchen folgendermaßen angestellt:

5 tuberkulöse Meerschweinchen, die 8 Wochen vorher intraperitoneal mit je $^1/_{10}$ Öse einer 14tägigen Glycerin-Agar-Kultur humaner Tuberkelbacillen infiziert worden waren, wurden geimpft: 1. mit der Lösung a des nicht eingeengten Filtrates

[1]) Siehe Fußnote Seite 142.

und 2. mit der Lösung b des konzentrierten Filtrates. Alle 5 Meerschweinchen zeigten nach 12, 24 und 48 Stunden auf intracutane Injektion der Lösung a keine Spur einer Reaktion; auf Injektion des konzentrierten Filtrates (Lösung b) reagierten 4 Meerschweinchen ebenfalls nicht, 1 Meerschweinchen zeigte an der Impfstelle eine Rötung und Infiltration ohne Nekrose.

Aus diesen Versuchen scheint uns eindeutig hervorzugehen, daß unsere Nährlösung nicht imstande ist, aus den Bakterienleibern Körper von typischer Tuberkulinwirkung zu extrahieren. Die äußerst unsichere Wirkung des konzentrierten Extraktes, wie sie sich bei einem von 5 Meerschweinchen in der Rötung und Infiltration der Impfstelle manifestierte, scheint viel eher auf den den Tuberkelbacillen anhaftenden Resten der wirksamen alten Kulturflüssigkeit zu beruhen als auf Körpern, die durch unsere Nährlösung den Bakterienleibern entzogen worden wären. Erscheinen daher gut nachweisbare Gifte in der von uns benutzten Nährlösung, so müssen wir annehmen, daß dieselben echte Stoffwechselprodukte der Tuberkelbacillen darstellen und an die Lebenstätigkeit derselben geknüpft sind.

II. Methode der Züchtung des Tuberkelbacillus und Darstellung des Tuberkulins aus eiweißfreien Nährmedien.

Das Studium der Tuberkulinbildung auf eiweißfreien Nährböden schien besonders geeignet zur Klärung der Frage, inwieweit ohne Beeinträchtigung der Giftbildung der Nährboden vereinfacht werden könne, und weiter, ob das so entstandene Gift einen chemisch einfacheren Körper darstelle als das auf eiweißhaltigem Nährboden gebildete.

In Bestätigung der Versuche von Proskauer und Beck, C. Fraenkel, Kühne, Jochmann[1]), Ruppel und Rickmann[2]) hat der eine von uns (L.) gezeigt, daß der Tuberkelbacillus auf eiweißfreien Nährböden sich vorzüglich weiter entwickelt. Zur Herstellung des Tuberkulins diente folgende Nährlösung, welche in 1 Liter Wasser enthielt:

[1]) Jochmann, Berichte des Kongresses f. innere Medizin, Wiesbaden 1910 und Deutsche med. Wochenschr. 1910.

[2]) Ruppel und Rickmann, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1910.

6 g Asparagin,
6 g milchsaures Ammon,
3 g neutrales Natriumphosphat,
6 g Kochsalz,
40 g Glycerin.

Während in der ersten und zweiten Generation das Wachstum ein kümmerliches war, der Bacillenrasen höchstens die Hälfte der Oberfläche einnahm, wurde in der sechsten Generation die Nährlösung völlig von einem etwas dünneren Rasen als bei der Glycerinbouillon bedeckt. Nach 3 Monate langem Wachstum nahm die Nährflüssigkeit einen gelben Ton an, der mit dem Alter der Kultur sich verstärkte.

Nach 3 bis 5 Monate langem Stehen im Brutschrank wurden gut gewachsene Kulturen teils durch Reichelkerzen, teils durch Papier filtriert und in dem Filtrate das Tuberkulin stets an tuberkulösen Meerschweinchen durch intracutane oder intraperitoneale Injektion bestimmt. Es ergab sich, daß in dieser Nährflüssigkeit derselbe spezifische Körper gebildet wird, den Robert Koch uns als Tuberkulin kennen gelehrt hat, und der sich bereits durch Kühne und in letzter Zeit durch Jochmann aus eiweißfreien Nährmedien hat herstellen lassen.

III. Die chemische Natur des Tuberkulins.

Wie die Durchsicht der einschlägigen Literatur über Tuberkulin lehrt, lassen sich die folgenden Tatsachen feststellen. Robert Koch selbst hat schon 1891 über die Natur des Tuberkulins Untersuchungen angestellt und gefunden, daß der auf eiweißhaltigen Nährlösungen gewonnene spezifische Körper alle Eiweißreaktionen gebe, den Albumosen und Peptonen am nächsten stehe, von den Eiweißkörpern jedoch sich durch seine Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen (mehrstündige Einwirkung von 120°) und seine leichte Dialysierbarkeit unterscheide, von der Peptongruppe durch seine Fällbarkeit mit Eisenacetat.

Von Kühne[1]) stammt der erste Versuch, ein Tuberkulin aus eiweißfreien Nährböden zu gewinnen. Er verwendete einen aus Leucin, Tyrosin, Asparagin, schleimsaurem Ammoniak, Taurin, Glycerin, Chlornatrium und der Asche von Liebig-

[1]) W. Kühne, Zeitschr. f. Biol. 30, 221, 1893.

schem Fleischextrakt zusammengesetzten Nährboden; die nach 2 Monate dauerndem Wachstum abfiltrierte Lösung enthielt Spuren von Albuminstoffen, keine Albumosen oder Peptone und sie wirkte, wie Kochs Untersuchungen ergeben hatten, ebenso temperatursteigernd wie das Ausgangspräparat. Kühne kam zu dem Schlusse, daß der wirksame Körper nicht isoliert sei, sondern allen von ihm dargestellten eiweißartigen Stoffen nur anhafte. Diese Untersuchungen Kühnes waren durch die damalige Prüfungstechnik des Tuberkulins sehr erschwert, da als ein einziges Kriterium der spezifischen Wirkung die Temperatursteigerung beim tuberkulösen Menschen gelten mußte.

Merkwürdigerweise wurde in der Folge der von Kühne beschrittene Weg bald wieder verlassen; denn alle anderen Untersuchungen sind am Original-Alttuberkulin, also an eiweißhaltigen Kulturflüssigkeiten, angestellt; es ist daher nicht verwunderlich, wenn die Untersuchungen das Resultat ergaben, daß der wirksame Bestandteil des Tuberkulins ein Eiweißkörper sei. So vertritt z. B. Matthes[1]) die Anschauung, daß die Wirkung des Tuberkulins am Pepton hänge, ja direkt dem Peptongehalt entspreche; Th. Pfeiffer[2]) und seine Mitarbeiter nehmen auf Grund der in jüngster Zeit durchgeführten Spaltungsversuche mit Pepsin, Pankreatin und Erepsin an, daß die Albumosen die wirksame Substanz seien.

Unsere eigenen Versuche knüpfen an die Untersuchungen Kühnes in eiweißfreien Nährlösungen an. Es war zunächst die Frage zu entscheiden, ob in der oben beschriebenen Nährlösung, in welcher mittels der intracutanen und intraperitonealen Injektion einwandfrei wirksames Tuberkulin nachgewiesen werden konnte, auch Eiweißkörper vorhanden seien. Zur Entscheidung dieser Frage wurden mit der von den Tuberkelbacillen abfiltrierten Lösung folgende Reaktionen angestellt:

1. Kochen bei neutraler und saurer Reaktion ergab keine Trübung.

2. Die Biuretprobe, als Schichtprobe aufgestellt, blieb negativ.

---

[1]) M. Matthes, Arch. f. klin. Med. 54, 66, 1895.

[2]) Th. Pfeiffer und H. Trunk, Zeitschr. f. Tuberk. 12, 177, 1908 und 13, 465, 1909. — Th. Pfeiffer und R. Persch, Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 33.

3. Die Millonsche Reaktion blieb negativ.

4. Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe: negativ.

5. Bleiacetat und Natronlauge: keine Dunkelfärbung beim Kochen.

6. Ammonsulfat bei voller Sättigung und wechselnder Reaktion: keine Fällung.

7. Molischs Reaktion ergibt eine intensive Violettfärbung.

8. Orcin-Salzsäurereaktion fällt negativ aus.

9. Die Flüssigkeit ist nicht imstande, Kupfersulfat in alkalischer Lösung zu reduzieren.

10. 95%iger Alkohol, im Überschuß zugesetzt, ergibt keine Fällung.

Nachdem wir uns durch Versuche überzeugt hatten, daß die Wirksamkeit unseres Tuberkulins selbst im strömenden Dampfe durch 2 Stunden nicht eine Einbuße erleidet, wurden die Kulturfiltrate auf dem Wasserbade bis zur Sirupdicke eingedampft; die zur Lösung des Rückstandes nötige Wassermenge entsprach einer 10 bis 15fachen Konzentration der Ausgangsmenge. Der Sirup löste sich in Wasser zu einer trüben, gelblich gefärbten Flüssigkeit, von der abfiltriert wurde.

Diese konzentrierte, schwach sauer reagierende klare Lösung gab folgende Reaktionen:

1. Kochen bei neutraler und schwach saurer Reaktion: Lösung bleibt völlig klar.

2. Halbsättigung sowie volle Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat läßt dieselbe völlig klar.

3. Essigsäure und Ferrocyankaliumprobe: bleibt klar.

4. Biuretreaktion: negativ.

5. Konzentrierte wässerige Sublimatlösung: keine Fällung.

6. Millons Reagens erzeugt reichliche Fällung in der Kälte; der Niederschlag löst sich unter leichter Rotfärbung beim Erhitzen; bei weiterem Erwärmen schwindet die Rotfärbung.

7. Jodquecksilberkalium und Salzsäure erzeugen eine flockige Fällung.

8. 10%ige Quecksilbersulfatlösung in schwefelsaurer Lösung: leichte flockige Fällung.

9. 10%ige Gerbsäure und Essigsäure: reichliche flockige Fällung.

10. Bromwasser: keine Rot-Violettfärbung der Flüssigkeit.

11. Reaktion nach Molisch: schöne Rot-Violettfärbung.

12. 95%iger Alkohol im Überschuß fällt einen weißen, flockigen Niederschlag.

Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge der nicht geimpften Nährlösung zur Sirupdicke eingeengt, in der gleichen Menge Wasser gelöst und dieselben Reaktionen ausgeführt: Sie blieben durchaus negativ bis auf eine Fällung mit Millons Reagens und mit 95%igem Alkohol; der Zusatz von Quecksilbersulfat in saurer Lösung erzeugte eine staubförmige Trübung.

Weitere Versuche, eine Reinigung der tuberkulinhaltigen Lösung herbeizuführen, wurden in der Weise unternommen, daß die konzentrierte wässerige Lösung im Alkoholüberschuß gefällt wurde; es ergab sich, daß die wirksame Substanz mit Alkohol niedergeschlagen wurde, während die alkoholische Lösung wirkungslos blieb.

Kurzdauernde Dialyse der konzentrierten Lösung ergab eine leichte Abschwächung der Wirksamkeit, länger dauernde Dialyse völligen Verlust.

Aus diesen Reaktionen geht hervor, daß selbst im 15fach konzentrierten Filtrat die tuberkulinhaltige Flüssigkeit sich zunächst als eiweißfrei erwiesen hat. Man muß annehmen, daß die wirksame, alkoholfällbare und dialysable Substanz weder ein Eiweißkörper im gewöhnlichen Sinne, noch eine Albumose oder ein Pepton ist. Dagegen deutet die Fällbarkeit mit Tannin und Jodquecksilberkalium auf Körper hin, die man unter den biuretfreien peptischen und tryptischen Spaltungsprodukten des Eiweißes findet und die von Fischer als Polypeptide bezeichnet worden sind. Bemerkenswert erscheint es, daß in der Kulturflüssigkeit die Kohlenhydratreaktion nach Molisch auftrat.

Für die weitere Umgrenzung der chemischen Natur des vorliegenden Körpers lag es nahe, Fermentreaktionen heranzuziehen, zumal es bereits durch Pfeiffer und seine Schüler festgestellt worden war, daß eiweißhaltiges Tuberkulin durch Verdauung mit Pepsin-Salzsäure und Trypsin-Soda vernichtet, durch Erepsin stark abgeschwächt wird.

Es war nun von großem Interesse, zu prüfen, wie sich dieses biuretfreie Tuberkulin gegenüber der Proteolyse verhalten wird. Zu diesem Zwecke wurde eine durch ein Papier-

filter geschickte Kultur, die 5 Monate lang gewachsen war und 0,5% Carbolsäure enthielt, der Pepsin- und Trypsinverdauung ausgesetzt.

Je 8 ccm des Filtrates wurden in folgender Weise verarbeitet:

Probe I wurde versetzt mit Salzsäure bis zum Gehalte 4‰;
„ II mit Salzsäure wie I und 0,25 g Pepsin Fairchild;
„ III mit Soda bis zum Gehalte von 4‰;
„ IV mit Soda wie III und 0,25 g Trypsin Rhenania;
„ V enthielt das Kulturfiltrat ohne Zusätze;
„ VI 8 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,25 g Pepsin;
„ VII 8 ccm „ „ + 0,25 g Trypsin.

Alle Proben blieben 4 Tage im Brutschranke, wurden hierauf neutralisiert, über freier Flamme gekocht und dann mittels der intracutanen Methode an tuberkulösen Meerschweinchen ausgewertet. Das Resultat der Prüfung gibt die folgende Tabelle, wobei als positive Reaktion ein ungefähr 1 cm breites Infiltrat mit zentraler Nekrose bezeichnet wurde, während das Ausbleiben der Infiltratbildung den negativen Ausfall bedeutete:

Meerschweinchen	Nr. 343	Nr. 217	Nr. 320	Nr. 309
I 8 ccm Filtrat + 4‰ Salzsäure . .	positiv	positiv	positiv	positiv
II 8 „ „ + 4‰ „ + 0,25 g Pepsin	negativ	negativ	negativ	negativ
III 8 ccm Filtrat + 4‰ Soda	positiv	positiv	positiv	positiv
IV 8 „ „ + 4‰ „ + 0,25 g Trypsin	negativ	negativ	negativ	negativ
V Kontrolle 8 ccm Kochsalzlösung + 0,25 g Pepsin	„	„	„	„
VI Kontrolle 8 ccm Kochsalzlösung + 0,25 g Trypsin	„	„	„	„
VII 8 ccm Filtrat allein	positiv	positiv	positiv	positiv

Es ergibt sich, daß die 4tägige Verdauung des Tuberkulins mit Pepsin-Salzsäure und mit Trypsin-Soda zur völligen Zerstörung des wirksamen Körpers führt, während weder die gleich lange Einwirkung von Salzsäure oder Soda allein die Tuberkulinwirkung zu beeinflussen imstande ist. Es muß aus der Wirkung der proteolytischen Fermente geschlossen werden, daß die toxische Substanz durch diese Agenzien spaltbar ist und daher aller Wahrscheinlichkeit nach einen Eiweißabkömm-

ling darstellt. Die früher angeführten Reaktionen haben gezeigt, daß es sich um ein tiefstehendes Eiweißspaltungsprodukt handeln dürfte, dem die meisten charakteristischen Eiweißreaktionen fehlen. Von den uns bisher bekannten Eiweißspaltungsprodukten weisen die Polypeptide mit unserer Substanz die beste Übereinstimmung auf sowohl in bezug auf die Fällbarkeit gegenüber den benutzten Reagenzien, als auch in bezug auf ihr Verhalten zu den proteolytischen Fermenten, und wir möchten sie daher vorläufig dieser Gruppe von Körpern zuweisen; eine nähere Identifizierung mit dem Bau der Polypeptide kann allerdings erst durch weitere Isolierung und Aufspaltung des wirksamen Körpers erbracht werden, eine Aufgabe, der wir uns nach Herstellung größerer Mengen des nötigen Materials zu unterziehen gedenken.

Die Tatsache, daß ein durch proteolytische Fermente spaltbarer Eiweißabkömmling der Träger der Tuberkulinwirkung ist, steht in Übereinstimmung mit den eingangs erwähnten Untersuchungen Th. Pfeiffers und seiner Mitarbeiter über das eiweißhaltige Tuberkulin Kochs, das ebenfalls der Einwirkung von Pepsin, Trypsin und Erepsin nicht standhalten konnte. Die vorliegenden Befunde scheinen uns indes dadurch ein Interesse zu beanspruchen, weil die von uns verwendete Kulturflüssigkeit aus einfach zusammengesetzten, eiweißfreien Körpern besteht, aus denen die Bakterienzelle erst das eiweißartige Gift aufzubauen gezwungen war. Ob für den Aufbau des Tuberkulins in eiweißhaltigen Nährböden derselbe Entstehungsmodus angenommen werden soll, muß vorläufig dahingestellt bleiben. In diesem Falle müßte dem Aufbau aus den Spaltungsprodukten eine Spaltung des vorhandenen Eiweißes vorausgehen; für diese Annahme würde vielleicht sprechen, daß eine Tuberkulinwirkung in der Glycerinbouillon relativ später nachweisbar wird, als in den von uns verwendeten eiweißfreien Nährböden. Es ist aber deshalb durchaus nicht zwingend anzunehmen, daß die Zusammensetzung des Tuberkelbacillengiftes in den eiweißfreien und eiweißhaltigen Nährböden dieselbe sein und etwa das von uns beschriebene polypeptidartige Tuberkulin auch in eiweißhaltigen Nährmedien sich in gleicher Zusammensetzung vorfinden und den daselbst gelösten Eiweißkörpern bloß anhaften müsse. Es ist vielmehr

die Möglichkeit offen zu lassen, daß der Tuberkelbacillus auf eiweißhaltigen oder andersartigen, geeigneten Nährlösungen nicht nur die eiweißartigen Bestandteile seines Zelleibes aufzubauen vermag, sondern daß auch das von ihm produzierte Gift unter günstigen Bedingungen nicht auf der Polypeptidstufe seines Aufbaues stehen bleibt, sondern sich in seinem Aufbau den echten Eiweißkörpern noch weiter nähert und so unter Umständen die Pepton- und Albumosenstufe zu erreichen vermag. Es ist naheliegend, daß dieser Auffassung des Aufbaues derartiger Bakteriengifte von Antigencharakter um so mehr allgemeine Bedeutung zukommt, als wir auch bei anderen Stoffwechselprodukten der Bakterien unter Benutzung eiweißfreier Nährmedien einschlägige Beobachtungen machen konnten, über die später berichtet werden soll.

Fassen wir die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zusammen, so ergibt sich, daß es gelingt, auf eiweißfreien Nährböden ein gut wirksames Tuberkulin zu erhalten, das als echtes Stoffwechselprodukt der Tuberkelbacillen aufzufassen ist; dasselbe ist ein hitzebeständiger, dialysabler, alkoholunlöslicher Körper, der keine Biuretreaktion gibt, durch Gerbsäure, Jodquecksilberkalium und Quecksilbersulfat in saurer Lösung fällbar und durch Pepsin-Salzsäure und Trypsin-Soda zerlegbar ist.

Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Menschenblut.

Von

H. Lyttkens und J. Sandgren.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

In einer früheren Mitteilung[1]) haben wir Untersuchungen über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Kaninchenblut veröffentlicht. Im folgenden werden wir über die Verhältnisse des Menschenblutes berichten.

Unsere Versuche wurden nach derselben Methodik wie früher ausgeführt. Was wir hierbei besonders hervorheben möchten, ist, daß wir nicht wie die meisten andern Untersucher auf diesem Gebiete die Reduktion der Blutkörperchen aus der Differenz von Serum und Vollblut berechneten, sondern sowohl Körperchen wie Serum oder Plasma direkt untersuchten. Das Blut war größtenteils Placentarblut aus dem hiesigen Gebärhause, also von dem Kinde herstammend. Doch stimmten die Ergebnisse mit Blut von drei Medizinstudierenden völlig mit denen des Säuglingsblutes überein, wie auch aus der Tab. I hervorgeht, in der unsere analytischen Befunde zusammengestellt sind.

Kontrolluntersuchungen betreffs der Gärung wurden angestellt. Das Blut wurde in Oxalat ($Na_2O_4C_2$ in Substanz zirka $2\,^0/_{00}$) aufgefangen. Daß eine Glucolyse nicht stattgefunden hat, zeigen die Versuche 10 bis 12, wo das Blut unmittelbar nach dem Aderlaß verarbeitet wurde.

Die Tabelle (S. 154) zeigt, daß sowohl die Blutkörperchen wie das Serum reduzierende Stoffe enthalten und daß die Reduktion der Blutkörperchen (als $375\,^0/_{00}$ des Blutes berechnet) nicht

[1]) Lyttkens und Sandgren, diese Zeitschr. 26, 382, 1910.

viel geringer ist als die des Serums, indem die durchschnittlichen Werte 0,069% und 0,103% sind. Bei den Blutkörperchen sind die Differenzen von 0,037% bis 0,111%, beim Serum von 0,071% bis 0,136%. Dagegen hat sich der bemerkenswerte Unterschied herausgestellt, daß die Blutkörperchenreduktion keineswegs von einem entsprechenden Traubenzuckergehalt herrührt. Im Gegenteil enthalten die Blutkörperchen keinen oder so gut wie keinen Traubenzucker, und die ganze Glucosemenge befindet sich im Serum. Doch entspricht auch nicht die ganze Serumreduktion Traubenzucker, indem nicht weniger als 40% der Reduktion von anderen reduzierenden Substanzen herrühren.

Tabelle I.

Versuch Nr.		Blutmenge	Blutkörperchen			Serum		
			Reduktion vor Gärung	Reduktion nach Gärung	Dextrose	Reduktion vor Gärung	Reduktion nach Gärung	Dextrose
		g	%	%	%	%	%	%
1	Placentarblut	20,7	0,050	0,040	0,010	0,083	0,042	0,041
2	„	18,9	0,089	0,074	0,015	0,127	0,048	0,079
3	„	29,8	0,090	—	—	0,071	0,045	0,026
4	„	27,3	0,046	0,041	0,005	0,107	0,053	0,054
5	„	21,8	0,061	0,061	0,000	0,087	0,040	0,047
6	„	16,4	0,075	0,079	0,000	0,136	0,035	0,101
7	„	46,4	0,037	0,035	0,002	0,071	0,031	0,040
8	„	39,9	0,080	—	—	0,114	0,049	0,065
9	„	51,9	0,111	0,094	0,017	0,092	0,038	0,054
10	cand. med. H. L-s	55,7	0,058	0,051	0,007	0,114	0,030	0,084
11	cand. med. J. F-x	65,0	0,061	0,055	0,006	0,109	0,033	0,076
12	cand. med. O. H-n	26,2	0,072	0,072	0,000	0,132	0,042	0,090
	Durchschnitt		0,069	0,060	0,006[1])	0,103	0,040	0,063

Der Gehalt des Serums an Traubenzucker ist durchschnittlich 0,06%, scheint aber beim Säugling recht variabel. Dagegen ist der Zuckergehalt beim Erwachsenen — wenn man aus 3 Versuchen Folgerungen ziehen kann — regelmäßiger und etwas, obwohl nicht viel, höher.

Dieser wahre Zuckergehalt des Blutes verdient eine besondere Beachtung, wenn man damit den Zuckergehalt des Menschenharns vergleicht und besonders wenn man berück-

[1]) Man sollte aus der Differenz 0,009 erwarten. 0,006 entspricht aber den gefundenen Werten, da zwei Bestimmungen fehlen.

sichtigt, daß ein Teil des Blutzuckers sicher in gebundener Form (siehe unten) vorkommt. Nach Lavessons[1]) Untersuchungen ist der Zuckergehalt des Harnes durchschnittlich 0,04% (etwas geringer beim Säugling). Der normale Zuckergehalt des Harnes ist also nicht viel kleiner als der Gehalt des Blutes.

Ein nicht geringes Interesse bietet der Vergleich des Menschen- und Kaninchenblutes[2]) dar. Betrachten wir zuerst den Zuckergehalt des Serums, über den Tabelle II unterrichtet.

Tabelle II.

Menschenblut		Kaninchenblut	
Versuch Nr.	Serum Dextrose %	Versuch Nr.	Serum Dextrose %
1	0,041	9	0,208
2	0,079	10	0,194
3	0,026	11	0,276
4	0,054	13	0,210
5	0,047		
6	0,101		
7	0,040		
8	0,065		
9	0,054		
10	0,084		
11	0,076		
12	0,090		
Durchschnitt	0,063		0,222

Es hat sich also die bemerkenswerte Tatsache herausgestellt, daß der normale Zuckergehalt des Kaninchenserums (und Blutes) 3 bis 4mal höher ist als beim Menschenblut und Serum (0,22% gegen 0,06%).

Es ist ganz klar, daß die alte, noch geläufige These Cl. Bernards über das Verhältnis zwischen Glucämie und Glucosurie keineswegs haltbar sein kann. Und besonders darf man absolut nicht die Befunde beim Kaninchen — das gewöhnlichste Versuchsobjekt — ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen.

Was beim Kaninchen das Normale ist, stellt beim Menschen eine erhebliche Hyperglykämie dar.

Gehen wir jetzt zu den übrigen reduzierenden Stoffen über; diese entsprechen beim Menschenserum durchschnittlich

[1]) Lavesson, diese Zeitschr. 4, 40, 1907.
[2]) Lyttkens und Sandgren, l. c.

0,04%. Die parallelen Werte beim Kaninchen sind 0,034%, 0,042%, 0,032% und 0,07% oder im Durchschnitt 0,045%. Die Restreduktion des Serums ist beim Menschen und Kaninchen dieselbe.

Die Restreduktion der Menschenblutkörperchen war 0,06%. Beim Kaninchen wurde gefunden: 0,085%, 0,041%, $<$ 0,071%[1]) und 0,114% oder durchschnittlich ca. 0,07%. Die Restreduktion der Blutkörperchen ist auch beim Menschen und Kaninchen übereinstimmend, und für beide Blutsorten trifft auch zu, daß die Blutkörperchen keinen Traubenzucker enthalten (0,006% bzw. 0,002%). Den einzigen, aber wichtigen Unterschied zwischen den beiden Blutsorten stellt also der Gehalt an Traubenzucker dar.

Ebenso wie beim Kaninchenblut enthält das Mensehenblut auch sog. „virtuellen" Zucker (Lepine), der beim Kochen der Serum- bzw. Blutkörperchen bei schwach saurer Reaktion freigemacht wird. Dies findet selbstverständlich nicht beim Vollblut statt, wo nur der Alkoholextrakt verwendet wird.

Tabelle III.

Versuch Nr.		Totalreduktion v. Gärung %	Differenz %	Reduktion nach Gärung %	Differenz %
4	Vollblut	0,070	0,014	0,032	0,016
	Blutkörperch. + Serum	0,084		0,048	
5	Vollblut	0,048	0,029	0,021	0,027
	Blutkörperch. + Serum	0,077		0,048	

Unsere Befunde bestätigen also die alte Auffassung, daß nur das Serum Traubenzucker enthält. Sie stehen aber im Widerspruch zu den neueren Untersuchungen von Hollinger[2]), Frank[3]), Michaelis und Rona[4]) sowie Rona und Takahashi[5]).

Betreffs Hollingers und Franks Befunde ist zu bemerken, daß diese Forscher die Totalreduktion von Vollblut und Serum bestimmten; aus der Differenz wurde der „Zucker"-

[1]) Zweiter Aderlaß.

[2]) Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

[3]) Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 139, 1910.

[4]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 26, 60, 1908; 18, 375, 1909.

[5]) Rona und Takahashi, diese Zeitschr. 30, 99, 1910.

gehalt der Blutkörperchen berechnet. Die Verfasser haben also keine Rücksicht auf die übrigen reduzierenden Substanzen im Blute genommen, sondern identifizieren einfach die reduzierenden Stoffe mit Zucker. Ihre Befunde stimmen aber vorzüglich mit den unseren überein, wenn sie folgern, daß der „Zucker" im Menschenblut gleichmäßig in Serum und Körperchen verteilt sind, und man statt Zucker das richtige Wort „Totalreduktion" einführt. Wir haben ja auch gefunden, daß die Reduktion der Blutkörperchen nicht wesentlich geringer ist als die des Serums. Dasselbe haben übrigens auch Lepine und Boulud[1]) beim Hund gefunden, welche Forscher aber auch nicht den wahren Zuckergehalt festgestellt haben.

Stellt man also die Serumreduktion der Reduktion von Blutkörperchen + Serum gegenüber wie in der Tabelle IV (S. 158), so tritt die Übereinstimmung ganz unzweifelhaft hervor.

Die Totalreduktion ist also übereinstimmend; erst bei der Bestimmung der Dextrose tritt der Unterschied hervor.

Michaelis und Rona haben dagegen auch ihre Lösungen vergoren und trotzdem mit Hollinger und Frank übereinstimmende Werte gefunden. Hierbei ist die Methodik entscheidend. Michaelis und Rona bestimmten den Zucker durch Polarisation vor und nach der Gärung, wir aber nach Bangs Methode der Blutzuckerbestimmung mit kleinen für Serum und Blutkörperchen abgeänderten Modifikationen. Es fragt sich also, welches Verfahren zur Blutzuckerbestimmung das zuverlässigste ist. Die optische Methode erfreut sich keines guten Rufes.

Fränkel[2]) bemerkt z. B., daß diese Methode hier ganz unbrauchbar ist. Dies ist durchaus zutreffend. Denn 1. kann das Blut andere drehende Substanzen enthalten und weist sie tatsächlich auf, und man kann a priori nicht wissen, inwieweit diese nach der Gärung unverändert geblieben sind. 2. Wie Neuberg[3]) gefunden hat, treten bei der Gärung neue drehende Substanzen auf. 3. Schließlich muß man hierbei

---

[1]) Lepine und Boulud, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 1, 149, 583, 1909.

[2]) Sigmund Fränkel, Deskript. Biochem. Wiesbaden 1907, S. 50.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 430, 1910.

Tabelle IV.

Versuch Nr.		Totalreduktion %	Dextrose %
1	Blutkörperchen + Serum	0,071	0,030
	Serum	0,083	0,041
2	Blutkörperchen + Serum	0,112	0,055
	Serum	0,127	0,079
3	Blutkörperchen + Serum	0,078	—
	Serum	0,071	0,026
4	Blutkörperchen + Serum	0,084	0,036
	Serum	0,107	0,054
5	Blutkörperchen + Serum	0,077	0,029
	Serum	0,087	0,047
6	Blutkörperchen + Serum	0,113	0,062
	Serum	0,136	0,101
7	Blutkörperchen + Serum	0,060	0,028
	Serum	0,071	0,040
8	Blutkörperchen + Serum	0,101	—
	Serum	0,114	0,065
9	Blutkörperchen + Serum	0,099	0,040
	Serum	0,092	0,054
10	Blutkörperchen + Serum	0,093	0,055
	Serum	0,114	0,084
11	Blutkörperchen + Serum	0,091	0,050
	Serum	0,109	0,076
12	Blutkörperchen + Serum	0,109	0,056
	Serum	0,132	0,090
Durchschnitt:	Blutkörperchen + Serum	0,091	0,046
	Serum	0,103	0,063

besonders berücksichtigen, daß der abgelesene Drehungswinkel bei dem geringen Zuckergehalt nur sehr gering ist. Rona und Takahashi geben von $+0{,}2°$ bis $+0{,}5°$ an. Sie erklären zwar, daß der mittlere Fehler nur $\pm 0{,}01°$ beträgt. Früher haben aber Michaelis und Rona[1]) denselben Fehler zu „höchstens 0,05°“ oder durchschnittlich bis $\pm 0{,}025°$ angegeben. Der Ablesungsfehler kann also bis 20% ansteigen! Wenn man hierzu den durch die Gärung selbst bedingten Polarisationsfehler addiert, kann man sehr wohl die unrichtigen Versuchsergebnisse dieser Forscher verstehen.

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 14, 480, 1908.

Zur Theorie der Enzymwirkung.

Von

Oscar Loew.

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

Es ist bekannt, daß die Lösungen der Enzyme durch Erwärmen auf 60 bis 80°, sowie durch verdünnte Säuren und Alkalien so leicht ihre Wirksamkeit verlieren, daß nur der Schluß übrig bleibt auf das Vorhandensein von labilen Atomgruppen, die durch Umlagerungen leicht verändert werden. Chemische Labilität und chemische Arbeit hängen somit aufs engste zusammen. Da man die chemische Arbeit der Enzyme durch Erhöhung der Temperatur bis nahe zur Tötungsgrenze (Umlagerungsmoment) steigern kann, so kann nicht anders geschlossen werden, als daß hier die thermische Energie chemische Arbeit geleistet hat. Da aber getötete Enzyme hierzu unfähig sind, so ist weiter zu schließen, daß nur die labilen Atome jene Leistung vermittelten, indem dieselben thermische erst in chemische Energie umwandeln, bevor die Arbeit geleistet wird. Diese Umwandlung geht hier so leicht vonstatten, wie die des elektrischen Stromes in Licht. Ich habe deshalb schon früher den Satz ausgesprochen,[1]) daß labile Atomgruppen befähigt sind, schon bei relativ niederer Temperatur thermische in chemische Energie umzuwandeln. Die thermische Energie kann hierbei entweder durch die Respiration der Zellen oder durch das Wärmereservoir unserer Atmosphäre oder durch eine künstliche Wärmequelle geliefert werden.

Ich meinte, daß meine Ausführungen für jeden, der in der theoretischen organischen Chemie etwas bewandert ist, leicht

[1]) Physikalisch-chem. Centralbl. 5, 609. Siehe auch Pflügers Archiv 1904, 96.

verständlich gewesen wären und war deshalb nicht wenig überrascht, als in der kürzlich erschienenen 3. Auflage des Werkes von Prof. Carl Oppenheimer folgende merkwürdigen Sätze[1]) in bezug auf obige Darlegung erschienen.

„Die Fermente sind danach sehr labile Substanzen, die sich sozusagen explosionsartig zersetzen und dadurch Bewegungen übertragen. In einer neueren Arbeit glaubt Loew, daß es sich nicht um Aldehyde, sondern um Ketone handelt, was er und Aso dadurch zu stützen trachten, daß Hydrazin usw. giftig auf Enzyme wirken. Diese Dinge sind aber rein spekulativ, wenn auch die Grundannahme, daß die Fermente labile Gruppen enthalten, nicht von der Hand zu weisen ist."

Der Schreiber dieser Sätze, Herr Prof. Herzog, hat sich vielleicht nicht die Mühe genommen, meine Darlegungen wirklich verstehen zu wollen, sonst hätte er unmöglich von Explosion und Spekulation reden können. Bei der Wichtigkeit der Sache und der großen Verbreitung jenes sonst so gründlichen Werkes bin ich gezwungen, meine Anschauungen in leicht verständlicher Form nochmals zusammenzufassen.

Es wird hier vor allem nötig, den Begriff der chemischen Labilität zu definieren. Es genügt nicht, labile Atomgruppen schlechtweg als „leichtveränderliche" zu definieren, denn es ergibt sich bei näherer Betrachtung bald, daß zweierlei grundverschiedene Arten von chemischer Labilität zu unterscheiden sind, worauf ich schon vor Jahren hingewiesen habe.[2]) Ich unterschied dieselben als potentiell-labil und kinetisch-labil oder als statisch und dynamisch, je nachdem die zur Äußerung kommende chemische Energie bloß aufgespeichert ist oder in kontinuierlich tätiger Form ausgeübt wird. Bei jener Form von Labilität kann die aufgespeicherte chemische Energie[3]) durch geringfügige Ursachen plötzlich kinetisch werden, wobei eine so heftige Neulagerung der Atome stattfindet, daß eine Explosionserscheinung eintritt, wie bei Nitroglycerin, Acethylenkupfer, Knallquecksilber, Diazotetrazotsäure und anderen Diazo-

[1]) Allgemeiner Teil S. 26 und 27.

[2]) So in der ersten Auflage meiner Schrift: Die chemische Energie der lebenden Zellen. München 1899, S. 135.

[3]) Selbstverständlich ist diese intramolekular aufgestapelte chemische Energie verschieden von der erst durch Vereinigung mit Sauerstoff bei der Verbrennung freiwerdenden sog. „Sonnenenergie" der organischen Substanzen.

körpern, organischen Peroxyden und Ozoniden. Von der ursprünglichen Struktur der Moleküle bleibt hier gar nichts mehr erhalten, und die freiwerdende chemische Energie äußert sich zum Teil in Form von thermischen und mechanischen Effekten.

Eine kontinuierliche Energieäußerung wäre hier nur möglich, wenn die Explosionen in gewissen kleinen Zeiträumen nacheinander stattfinden würden wie bei dem Gasmotor. Es ist klar, daß hier die Energieleistung von einer stetigen Substanzzertrümmerung begleitet ist, und nur eine große Kurzsichtigkeit könnte deshalb die Enzymwirkung mit einer solchen Art von Energieäußerung vergleichen, denn die Enzyme bleiben ja bei ihrer Arbeitsleistung völlig unverändert.

Herzog tut mir sehr unrecht, wenn er mir solche Ansichten zuschreibt, denn ich habe im Gegenteil stets die Anwendung der Explosionshypothese auf die Äußerungen lebender Zellen oder Enzyme bekämpft.[1]) Wenn man die Enzymwirkung überhaupt mit einer Maschinentätigkeit vergleichen will, so paßt am besten der Vergleich mit einem Heißluftmotor, durch welchen zugeführte Wärme direkt in mechanische Arbeit umgewandelt wird, während bei den Enzymen die Wärme durch labile Gruppen chemische Arbeit leistet.

Es kann sich bei den Enzymen nur um eine kinetische Labilität handeln.

Seit lange weiß man, daß gewisse Atomgruppen leichter reagieren als andere, daß gewisse Wasserstoffatome z. B. leichter substituierbar sind als andere in demselben Molekül; man weiß, daß gewisse Stoffe sich leicht an der Luft von selbst oxydieren, andere, chemisch sogar sehr nahestehende aber nicht. Es ist bekannt, daß manche Stoffe sich sehr leicht kondensieren, andere sich polymerisieren. Alle diese Zustände belegt man mit dem Worte „chemische Labilität". Aber es ist eine andere Art als die oben geschilderte, denn die Veränderungen führen niemals zu einer Zertrümmerung des Moleküls unter Auslösung potentieller Energie. Die Struktur bleibt im Gegenteil oft bis zu gewissem

[1]) So heißt es z. B. in der ersten Auflage meiner oben zitierten Schrift S. 150: „Der Leser wird sich indessen schon überzeugt haben, daß jener Vergleich — mit einer Explosion — gar nicht paßt." Siehe auch zweite Auflage, S. 119, wo der Vergleich der aktiven Proteine in der lebenden Zelle mit einer explosiven Substanz verworfen wird.

Grade erhalten, ja manchmal ist das Umwandlungsprodukt sogar leicht wieder in die ursprüngliche Verbindung zurückzuführen. Diese kinetische Labilität ist bedingt durch ein vergrößertes Schwingungsvolumen und dieses wieder dadurch, daß zwei oder mehrere benachbarte Atome zugleich auf ein und dasselbe Atom einwirken.[1]) Infolgedessen kann das in größeren Schwingungen befindliche labile Atom leichter Affinitäten nach außen entwickeln, es wird leichter substituierbar oder oxydierbar, es kann zu Kondensationen führen. Wird dann ein solcher Vorgang ausgelöst, so tritt im Moment der Reaktion Wärme auf, die chemische Energie des labilen Atoms ist verschwunden und damit das große Schwingungsvolumen; es hat mit dem Verlust der chemischen Energie in Form von Wärme zugleich eine molekulare Kontraktion stattgefunden.

Das Schwingungsvolumen des für Aldehyde und Ketone charakteristischen Carbonylsauerstoffatoms wurde zu 12,2 bestimmt, gegenüber dem von 7,8 für das Hydroxylsauerstoffatom. Es kann also daraus geschlossen werden, daß der chemischen Energie eine größere Schwingungsamplitude und Schwingungsdauer zukommt als der thermischen; denn die stabilen Atome in einer Verbindung unterliegen ja bei gewöhnlicher Temperatur nur der umgebenden thermischen Energiebewegung.[2]) Das

---

[1]) Man kann sich davon z. B. ein Bild machen, wenn man einem aufgehängten eisernen Gegenstand von passender Form einen oder zwei Magneten nähert.

[2]) Ich habe schon vor nahezu 30 Jahren den Zusammenhang zwischen dynamischer Labilität mit Energieleistung betont. So heißt es in Pflügers Archiv 22, 510 in einer Anmerkung: „Es scheint mir, daß die Schwingungen in der Aldehydgruppe durch die Nähe von Amidogruppen gesteigert werden, wodurch dann die Leistungen der ungeformten Fermente noch besser verständlich würden." In der Schrift: Die chemische Kraftquelle im lebenden Protoplasma, München 1882, S. 20, heißt es: „Wir wissen, daß mit der Steigerung der inneren Bewegung durch Wärmezufuhr, bei einem organischen Körper auch seine Zersetzlichkeit, seine Neigung, mit anderen Körpern sich zu verbinden, wächst. Umgekehrt dürfen wir schließen, daß solche Körper, die wie die Aldehyde schon bei gewöhnlicher Temperatur leicht reagieren, eine bedeutende Bewegung gewisser Atomgruppen besitzen." Nägelis Theorie der Fermentwirkungen nimmt zwar gewisse Schwingungen an, die von Enzymen ausgehen — aber jede Begründung, wie diese Schwingungen zustande kommen sollen, fehlte noch.

Schwingungsvolumen des Stickstoffatoms in der Cyangruppe ist ca. 7 mal so groß als das des Stickstoffatoms in der Amidogruppe, dementsprechend sind auch Cyangruppen sehr labiler Natur, wie bei Nitrilen und der Cyansäure zutage tritt. Aber nicht nur die Bestimmungen des Schwingungsvolumens, sondern auch die Verbrennungswärme kann zum Verständnis der Energie labiler Gruppen herangezogen werden.

Sehr richtig schließt Stohmann, wenn er sagt: „Die Gesamtverbrennungswärme organischer Verbindungen besteht aus zwei Teilen; der größere Anteil wird bestimmt durch die Zahl und Art der Atome, der andere, kleinere, durch die Stellung der Atome im Molekül; letztere ist es, die in enger Beziehung zum Molekularvolumen, Schmelz- und Siedepunkt, Lichtbrechungsvermögen und dem Grade der Beständigkeit steht."

Als besonders interessante Fälle von chemischer Labilität seien folgende erwähnt: Amidoäthylaldehyd (E. Fischer) und Diamidoaceton (Rügheimer und Mieschel) erleiden bald nach ihrer Darstellung eine Veränderung, ebenso Chinondiimid (Willstätter) und Imidodihydroxamsäure (Bamberger). Große Neigung zu spontaner Polymerisation besitzen die Dialdehyde von Korksäure, Glutarsäure und Bernsteinsäure, sowie die labile Form von Cyclooctadien (Willstätter). Große Reagierfähigkeit ist dem Fulven (Thiele), den Ketenen (Staudinger) und dem Monobromacetylen eigen. Orthoaminobenzaldehyd (P. Friedländer) erleidet leicht Umlagerung.

Nach Claisen existieren in der Benzolreihe 1,3 Diketone in zwei verschiedenen Formen. Es hängt von der Natur der eingetretenen Radikale, der Temperatur und der Natur des Lösungsmittels ab, welche Form die beständigere ist. Ähnliches gilt für die tautomeren Formen des Diacetbernsteinsäureesters (Knorr), des Phenylformylessigesters von Wislicenus und des Acetessigesters. Geht die Keto- in die Enolform über, so handelt es sich um eine bedeutende Wanderung eines Wasserstoffatoms, wobei der Ketonsauerstoff durch Übergang in Hydroxyl sein großes Schwingungsvolum verliert, während durch die entstehende doppelte Bindung zwischen den zwei Kohlenstoffatomen der in Reaktion tretenden Atomgruppen eine Vergrößerung des Schwingungsvolumens dieser Kohlenstoffatome stattfindet. So wechselt hier Kontraktion mit Expansion, sobald das labile Wasserstoffatom seine Stelle wechselt. Wir haben

hier ein Spiel von Bewegungserscheinungen, das durch chemische Energie bedingt und durch die thermische Energie der Umgebung unterhalten wird.

Es ist in dieser Beziehung von besonderem Interesse, daß, wie Kaufmann[1]) gefunden hat, Carbonylgruppen in Ketonen und Aldehyden zur Umwandlung von Energie auch in anderer Beziehung sich eignen, nämlich zur Umwandlung von Teslaströmen in Licht.

Wenn nun ein Stoff A mit labilen Atomen mit Molekülen eines anderen Stoffes B in innige Berührung kommt, deren Atome nicht schwer in Bewegung zu setzen sind, so kann entweder eine Reaktion zwischen beiden Stoffen eintreten und eine Verbindung sich bilden, oder die Übertragung der chemischen Energie von A auf die Atome von B kann in B selbst eine Veränderung erzeugen, während A unverändert bleibt. Ein solcher Fall liegt z. B. vor, wenn Cyangas in eine wässerige Lösung von Äthylaldehyd geleitet wird. Liebig hat hierbei die Bildung von Oxamid aus Cyan beobachtet, wobei der Äthylaldehyd nicht in Reaktion trat. Es liegt also hier eine Katalyse durch chemische Energie vor, ein Analogon zur Katalyse durch Lichtwirkung.

Behufs Übertragung von Energie ist noch die innigste Berührung ein Erfordernis. Daß dieselbe z. B. durch eine spezifische Konfiguration erreicht werden kann, geht aus einer Beobachtung E. Fischers an α- und β-Methylglucosid hervor.

Wie kann man nun die Natur von labilen Atomgruppen ergründen? Die organische Chemie kennt eine große Anzahl von charakteristischen Reaktionen behufs Erkennung von bestimmten Atomgruppierungen. Um die Carbonylgruppe zu erkennen, wendet man z. B. Phenylhydrazin an, wodurch sehr leicht ein sog. Phenylhydrazon gebildet wird. Im allgemeinen reagieren Hydrazin und Hydroxylamin sehr leicht mit Aldehyden und Ketonen, wobei unter Verlust der charakteristischen Eigenschaften Hydrazone resp. Oxime entstehen.

Wenn man nun Hydrazin oder Hydroxylamin bei gewöhnlicher Temperatur und in völlig neutraler Lösung mit Enzymen in Berührung läßt, so findet eine Einwirkung statt;

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33 und 35.

denn die Enzyme verlieren ihre charakteristische Eigenschaft, ihre Aktivität. Soll man nun Halt machen und die Logik begraben — oder soll man den Schleier wegreißen und den einzig zulässigen Schluß ziehen auf die Anwesenheit von Carbonylgruppen in den Enzymen und deren Beteiligung bei der Aktionsfähigkeit der Enzyme?

Ich hatte schon früher, im Jahre 1888, von der Vermutung ausgehend, daß es sich bei der Labilität der Enzyme um das gleichzeitige Vorhandensein von Aldehyd- und Amidogruppen handle, verdünnte neutrale Lösungen von freiem Hydroxylamin auf Diastase wirken lassen und gefunden, daß diese hierbei nach 24 Stunden Stehen unwirksam wurde.[1]) Später konstatierte ich die gleiche Erscheinung bei Katalase.[2]) Aso[3]), der auf meinen Vorschlag solche Studien fortsetzte, beobachtete: Hydroxylamin tötet in 1%iger neutralisierter Lösung bei 40° in 4 Stunden Pepsin, Trypsin und Diastase. Hydrazin tötet bei 40° in 2 Stunden ebenfalls dieselben Enzyme, während die Wirksamkeit von Emulsin erst in 8 Stunden bis auf Spuren vernichtet ist. Methylhydrazin tötet bei 40° in 4 Stunden Pepsin, Trypsin und Diastase völlig ab.

Wroblewsky[4]) fand, daß Zymaselösung auf Zusatz von 1,3% freien Hydroxylamins unwirksam wird.

Da ich nun keine Metallreduktion aus hochverdünnter, schwach alkalischer Silberlösung bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß durch Enzyme beobachten konnte, schloß ich, daß die mit Hydroxylamin und Hydrazin reagierenden Carbonyle mehr auf Ketonnatur als auf Aldehydnatur der Enzyme deuten.[5])

Um zu beobachten, ob Amidogruppen sich bei dem Zustandekommen des hohen Labilitätsgrades resp. der Arbeitsleistung der Enzyme beteiligen, ließ ich i. J. 1888 Formaldehyd, von dem wir wissen, daß er mit Amidogruppen leicht reagiert

---

[1]) Journ. prakt. Chem. 37, 104.

[2]) Catalase, a new enzyme of general occurrence, S. 29. U. S. Dept. of Agriculture, Washington 1901.

[3]) Bulletin, College of Agriculture, Tokyo, 6, 1905. Leider gelang es nicht, die Einwirkungsprodukte in krystallisierter Form zu gewinnen.

[4]) Centralbl. f. Physiol. 1898, Heft 12.

[5]) Manche Amidoketone reduzieren zwar auch, aber wie es scheint nicht bei sehr hoher Verdünnung der Silberlösung.

in 0,5%iger neutraler Lösung auf Enzyme wirken und beobachtete ein baldiges Unwirksamwerden von Pepsin und Diastase. Papayotin, Trypsin und Emulsin lieferten mit Formaldehyd ganz unwirksame Niederschläge. Katalaselösung wird in 1 Stunde durch Zusatz von 4% Formaldehyd unwirksam. Seither haben andere Autoren ähnliche Beobachtungen gemacht, Bokorny an Myrosin, Chymosin und Diastase, Pottevin an Invertase, Vines an Papain, Wroblewsky an Zymase.

Ein charakteristisches Reagens auf Amidogruppen ist salpetrige Säure, die damit entweder unter Bildung von hydroxylierten oder diazotierten Körpern reagiert. Je labiler die Wasserstoffatome in der Amidogruppe, desto leichter wird diese zerstört. Nun hat Wroblewsky (l. c.) beobachtet, daß Hefepreßsaft auf Zusatz von 0,5% salpetrigsauren Natrons bald die Wirksamkeit auf Glucose einbüßt. Aso (l. c.) hat sehr verdünnte Lösungen von Natriumnitrit und Natriumnitrat (zur Kontrolle) mit der berechneten Menge titrierter verdünnter Schwefelsäure versetzt und auf Enzyme wirken lassen, wobei sich ergab, daß die salpetrige Säure auf Pepsin, Trypsin und Emulsin viel schädlicher wirkte als die an Acidität stärkere Salpetersäure. Pepsin wurde bei 40° durch 2%ige salpetrige Säure in 1 Stunde, Trypsin durch 0,05%ige in 1 Stunde, Emulsin bei 18° in 16 Stunden durch eine 0,5%ige getötet. Es kommt hier also nicht die Acidität an sich in Betracht, die lediglich eine Umlagerung bewirkt hätte, bei der die Natur der sich umlagernden Gruppen nicht zutage treten kann, sondern es mußte jene spezifische Wirkung der salpetrigen Säure eingetreten sein. Anders liegt der Fall bei Diastase, die gegen Mineralsäuren überhaupt selbst bei großer Verdünnung sehr empfindlich ist; deshalb war kein eindeutiges Resultat zu erwarten.[1])

Diese sämtlichen hier erwähnten Tatsachen, die zur chemischen Charakterisierung von Enzymen gehören, werden nun in allen Werken über Enzyme einfach totgeschwiegen.

Eine interessante Analogie mit manchen Fermentwirkungen hat Neuberg[2]) bei Studien über Photokatalyse in Gegenwart von Eisensalzen und anderen Metallverbindungen beobachtet.

---

[1]) Weiteres siehe Pflügers Archiv 102, 106 bis 109, 1905,

[2]) Diese Zeitschr. 27, 271, 1910 und 29, 279, 1910.

„Molekularverkleinerung und Bildung von reaktionsfähigen Carbonylverbindungen" hat sich als das gemeinsame Charakteristikum dieser Lichtwirkungen erwiesen. Hier sind es die Lichtschwingungen, die in chemische Energie verwandelt werden, bei den Enzymen sind es die Wärmeschwingungen.

In neuerer Zeit hat auch Rosenthal[1]) die Ansicht vertreten, daß „den Enzymen eine gewisse kinetische Energie innewohnt, die sie auf andere Körper übertragen und dadurch deren Zerfall herbeiführen". Es gelang ihm, dieses durch einen Versuch sehr wahrscheinlich zu machen, bei dem Polysaccharide, Glucoside und Proteine durch Einführung in Solenoide, die von sckwankenden elektrischen Strömen durchflossen wurden, in ähnlicher Weise zerlegt wurden wie durch Enzyme.[2]) Er berührt auch die Frage nach der Spezifität der Enzyme — allein hier betritt man den Boden der Spekulation.

[1]) Sitzungsber. d. physikal.-mediz. Sozietät in Erlangen, 39, 557.

[2]) Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. 1908. Quantitative Daten wären hier erwünscht, ferner Angaben über Säurebildung usw.

Weitere Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Oxydationsgröße und Cytolyse der Seeigeleier.

Von

Jacques Loeb und Hardolph Wasteneys.

(Aus dem Rockefeller Institut, New York.)

(Eingegangen am 1. Januar 1911.)

Zwei Notizen, die O. Warburg vor kurzem in dieser Zeitschrift und in der Zeitschrift für physiol. Chem. veröffentlicht hat,[1]) haben ein Mißverständnis (für das wohl die Kürze unserer Darstellung verantwortlich ist) zur Voraussetzung, das wir aber korrigieren möchten, da es sonst leicht zu weiteren Mißverständnissen Veranlassung geben könnte. Er nimmt nämlich an, daß die Eier von Arbacia nicht, wie es tatsächlich der Fall ist, alle in einer reinen Chlornatriumlösung der Cytolyse verfallen, sondern nur 20% derselben; und er schließt deshalb, daß Wasteneys und ich seine „Erklärung der Cytolyse durch Messungen an Organismen widerlegen, die nicht cytolysieren und für die das von ihm bearbeitete Problem nicht existiert".

Wir vermuten, daß das Mißverständnis von Warburg durch folgenden Passus in unserer Arbeit[2]) veranlaßt war. „Wenn man Arbaciaeier 1 Stunde lang in eine Chlornatriumlösung bringt, so gehen meist nicht mehr als 20% der Eier an Cytolyse zugrunde, während die übrigen 80% sich, wenn man sie in normales Seewasser zurückbringt, zu schwimmenden Larven entwickeln." Wir hätten hier zufügen sollen, daß, wenn die Eier nicht nach 1 Stunde aus der reinen Chlornatriumlösung genommen werden, sie alle der Cytolyse ver-

[1]) Diese Zeitschr. 29, 414; Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 496.

[2]) Diese Zeitschr. 28, 340.

fallen.[1]) Die Cytolyse ist ein Vorgang, der Zeit erfordert und nicht bei allen Eiern gleichzeitig eintritt.

Wir haben also die Oxydationsvorgänge bei Eiern gemessen, die alle unter dem Einflusse der Chlornatriumlösung der Cytolyse verfallen, aber den Versuch beendet, als erst 20% der Eier zerstört waren. Wäre die Zerstörung der Eier in einer reinen Chlornatriumlösung durch eine erhebliche Erhöhung der Oxydationen (auf das 5fache) bedingt, wie Warburg annimmt, so hätte sich das doch wohl in einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches in unseren Versuchen zeigen sollen.

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 29, 80, 1910.

Nachtrag zu der Arbeit von H. Klein:

Über die Resorption von Cholesterinestern.

Von

A. Magnus-Levy.

(Diese Zeitschr. 29, 465.)

In der obigen Arbeit ist Bezug genommen worden auf einen Schluß, den Fraiser und Gardner aus Hämolyseversuchen nach Cholesterinfütterung auf die Form des Cholesterins im Blutserum ziehen, zugleich mit der Bemerkung und Begründung, daß mir dieser Schluß nicht bündig schiene. (Auf die Tatsache der Festigung gegen Hämolyse wurde dabei nicht eingegangen, da sie mit der Arbeit von Klein nicht in Beziehungen stand.) Auf Wunsch von Herrn Dr. Pribram trage ich hiermit nach, daß er den gleichen Versuch schon vor den englischen Autoren ausgeführt und den gleichen Schluß gezogen hat.[1])

[1]) Diese Zeitschr. 1, 414, 1906.

Über zuckerfreie Hefegärungen. I.

Von

C. Neuberg und A. Hildesheimer.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiolog. Instituts der Kgl. Landw. Hochschule zu Berlin.)

Vor kurzem haben Neuberg und Wastenson mitgeteilt[1]), daß bei der Einwirkung von Hydroperoxyd und Eisensalzen auf Aceton eine eigentümliche Oxydation des Acetons eintritt; aus den Reaktionsprodukten konnte mit p-Nitrophenylhydrazin das entsprechende Osazon des Methylglyoxals isoliert werden. Die Bildung desselben ist vielleicht im Sinne folgender Formeln zu deuten:

$\alpha)$ $CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 \longrightarrow CH_3 \cdot C(OH) : CH_2$

$\beta)$ $CH_3 \cdot C(OH) : CH_2 + H_2O_2 = CH_3 \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH$

$\gamma)$ $CH_3 \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH$

$\delta)$ $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH + O = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot CHO.$

Ferner hat sich herausgestellt, daß nach Abdestillieren der flüchtigen Produkte aus der zuvor neutralisierten Lösung noch eine stark reduzierende Substanz zurückblieb.

Es lag im Bereiche der Möglichkeit, daß durch Wiederholung des angegebenen Reaktionsmechanismus aus intermediär gebildetem Brenztraubenalkohol (Acetol) das kaum flüchtige Dioxyaceton entstanden wäre:

$\varepsilon)$ $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH \longrightarrow CH_2 : C(OH) \cdot CH_2OH$

$\zeta)$ $CH_2 : C(OH) \cdot CH_2OH + H_2O_2 = CH_2OH \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH$

$\eta)$ $CH_2OH \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH = H_2O + CH_2OH \cdot CO \cdot CH_2OH.$

Zur Prüfung dieser Annahme wurden Gärungsproben angestellt, da ja nach den Ergebnissen von G. Bertrand[2]), P. Boysen-Jensen[3]) sowie E. Buchner und J. Meisenheimer[4]) das Dioxyaceton gärbar ist.

---

[1]) Sitzung d. Berl. Physiol. Ges. vom 20. Januar 1911.

[2]) G. Bertrand, Annal. de Chem. et de Phys. [8], 3, 181, 1904.

[3]) P. Boysen-Jensen, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 666, 1908.

[4]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1773, 1910.

Tatsächlich fielen die Gärproben positiv aus, ohne daß es jedoch gelang, Dioxyaceton in Form des leicht erhältlichen Glycerosazons oder auf andere Art nachzuweisen; auch etwa durch Kondensation von Dioxyaceton gebildete Hexosen wurden gleichfalls nicht aufgefunden und konnten deshalb nicht für das Gärungsvermögen der Acetonoxydationsprodukte verantwortlich gemacht werden.

Diese Beobachtungen im Verein mit dem Befunde, daß ein Teil der reduzierenden, aus neutraler Lösung nicht flüchtigen Oxydationsprodukte des Acetons aus Brenztraubensäure[1]) bestand, gab uns Veranlassung, verschiedene Substanzen aus der 3-Kohlenstoffreihe bezüglich ihres Verhaltens zu Hefe zu prüfen.

Der Brenztraubenaldehyd (Methylglyoxal) $CH_3 \cdot CO \cdot COH$ ist von E. Buchner und J. Meisenheimer[2]) als unvergärbar durch Hefepreßsaft, von P. Mayer[3]) und A. Wohl[4]) als unangreifbar durch lebende Hefe erkannt. Darum ist die bestechende Ansicht, daß Methylglyoxal ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung sei [A. Wohl[4]), A. Windaus und F. Knoop sowie E. Erlenmeyer jun.] von Buchner und Meisenheimer[5]) verlassen.

Es ist nun zu bedenken, daß nach den grundlegenden Befunden von Battelli und Stern[6]) sowie von Parnas[7]) einfache Aldehyde in Berührung mit lebenden Zellen unbeständig sind und im Sinne der Cannizaroschen Reaktion zu dem entsprechenden primären Alkohol und dessen Säure unter Aufnahme von 1 mol. H_2O umgelagert worden:

$$\begin{array}{ccc} R \cdot COH & + H_2 & R \cdot CH_2OH \\ + & | & = \quad + \\ R \cdot COH & O & R \cdot COOH. \end{array}$$

[1]) Dieselbe entsteht wohl aus dem Methylglyoxal oder Acetol durch weitere Oxydation.

ϑ) $CH_3 \cdot CO \cdot COH + O = CH_3 \cdot CO \cdot COOH$

ι) $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH + O_2 = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot COOH.$

[2]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 3202, 1906.

[3]) P. Mayer, diese Zeitschr. 2, 435, 1906.

[4]) A. Wohl, diese Zeitschr. 5, 45, 1907.

[5]) Siehe Fußnote 4 Seite 170.

[6]) F. Battelli und L. Stern, Bull. de la Soc. biolog. 1910, Mai; diese Zeitschr. 28, 145, 1910.

[7]) J. Parnas, diese Zeitschr. 28, 274, 1910.

Im Sinne dieser Erfahrungen ergibt sich die Forderung, zu prüfen, wie sich die Umlagerungsprodukte des Methylglyoxals nach Cannizaro:

$$\begin{array}{l} CH_3 \cdot CO \cdot COH \quad H_2 \quad CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH \\ \quad + \qquad + \; | = \\ CH_3 \cdot CO \cdot COH \quad O \quad CH_3 \cdot CO \cdot COOH, \end{array}$$

d. i. Brenztraubenalkohol und Brenztraubensäure, zur Hefe verhalten. Zunächst wurde die leicht in reinem Zustande erhältliche Brenztraubensäure geprüft. Sie ergab in gewisser Hinsicht sofort ein positives Resultat. Sie liefert nämlich, in Form löslicher Salze verwendet, in den üblichen Gärungsröhrchen reichlich Kohlendioxyd.

Das Nähere ergeben folgende Versuchsprotokolle.

Benutzt wurden die gewöhnlichen Gärungsröhrchen nach Schrötter, mit 10 bis 11 ccm Inhalt des langen Schenkels. Temperatur in der Regel 36°. Hefemenge 1 bis 2 g auf 15 ccm der Lösung.

Versuch 1.

3%ige wässerige Lösung der Brenztraubensäure; innerhalb 24 Stunden keine CO_2-Entwicklung.

Versuch 2.

1%ige wässerige Brenztraubensäurelösung; in 36 Stunden keine Gärung.

Versuch 3.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Ammoniak; innerhalb 24 Stunden 8 ccm CO_2.

Versuch 4.

6%ige Lösung von brenztraubensaurem Ammoniak; nach 24 Stunden ca. 7 ccm CO_2.

Versuch 5.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; nach 24 Stunden 10 ccm CO_2.

Versuch 6.

4%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; nach 22 Stunden 9 ccm CO_2.

Versuch 7.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Calcium[1]; nach 24 Stunden ca. 7 ccm CO_2.

[1]) 5%ige Lösung der freien Säure mit $CaCO_3$ bei 40° bis zur neutralen Reaktion geschüttelt und filtriert.

Versuch 8.

3%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium lieferte bei 15° nach 20 Stunden ca. 1 ccm CO_2; nach 6stündigem Verweilen der Probe im Brutschrank bei 36° rund 7 ccm CO_2.

Versuch 9.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium ergab bei 33° innerhalb 6 Stunden etwa 1,5 ccm CO_2, nach 24 Stunden 9 ccm, nach 40 Stunden 11 ccm CO_2.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die freie Brenztraubensäure nicht, wohl aber ihre löslichen Alkali- und Erdalkalisalze mit Hefe „gären".

Die nach dem Ausfall der ersten Versuche anfänglich gehegte Vermutung, daß nur das Ammonsalz von der Hefe angreifbar sei, hat sich nicht bestätigt. Die Gegenwart von Stickstoff in Form des Ammonsalzes ist keineswegs erforderlich.

Deutlich ist eine gewisse Inkubationszeit erkennbar. Erst nach 8 bis 10 Stunden setzt kräftige Kohlensäureentwicklung ein.

Diese Verhältnisse illustriert übersichtlich

Versuch 10.

Derselbe ist mit der 5%igen Lösung des Kaliumsalzes in einem registrierenden Gärungsapparat angestellt, der von den Herren W. Caspari und R. von der Heide konstruiert ist.[1]) Es ergab sich, daß hierbei nach 6 Stunden 0,5 ccm, nach 12 Stunden 1,5 ccm, nach 24 Stunden 4 ccm und nach 46 Stunden 8 ccm CO_2 entwickelt waren. (Temperatur 28 bis 32°.)

Das von der Hefe aus brenztraubensauren Salzen erzeugte Gas ist scharf als Kohlendioxyd erkannt; es wird praktisch restlos von Kali- oder Natronlauge absorbiert.

So einfach die Feststellung des gasförmigen Gärungsproduktes ist, so wenig geklärt ist die Natur des oder der übrigen Gärungserzeugnisse. Bisher haben wir Äthylalkohol nicht nachweisen können.

Nach 24 Stunden ist im Gärgut Brenztraubensäure mit der Phenylhydrazinreaktion nach E. Fischer[2]) sowie mit der Nitroprussidnatriumprobe noch erkennbar. Nach 48 Stunden ist die Brenztraubensäure aber mehr oder minder vollständig verschwunden, wenn man einen erheblichen Hefenüberschuß

[1]) Sitzung der Berl. Physiol. Ges. vom 20. Januar 1911.

[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 17, 578, 1884.

angewandt hat. Die Reaktion ist nach den Vergärungen sauer, neutral oder auch schwach alkalisch befunden worden.

Bei dem

Versuch 11

mit 10 g Brenztraubensäure (als Ammonsalz) in 250 ccm Leitungswasser und 5 g Hefe wurde nach 54 Stunden die schwach sauer reagierende Flüssigkeit von der zu Boden gesunkenen Hefe abfiltriert und mit KOH alkalisch gemacht. Nachdem so ein Übergang von Spuren etwa noch vorhandener Brenztraubensäure verhindert war, wurde destilliert, und nach nochmaliger Zugabe von ca. 50 ccm H_2O wurden 100 ccm übergetrieben. Diese reagierten dank einem Gehalt an Ammoniak alkalisch und wurden deshalb nach Zusatz von verd. H_2SO_4 bis zur sauren Reaktion abermals überdestilliert. Selbst die ersten Tropfen des Destillates enthielten keine nachweisbare Menge Alkohol. (Kaliumbichromatprobe.)

Das Destillat zeigte folgende Reaktionen:

a) Liebensche Jodoformprobe war momentan positiv.

b) Gunningsche Jodoformreaktion positiv.

c) Ammoniakalische Silberlösung wird schwach, auf Zusatz von fixem Alkali sehr stark reduziert.

d) Mit Fehlingscher Mischung erfolgt geringe Reduktion bei gelindem Erwärmen, kräftige beim Kochen.

e) Mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge tritt gelbe Färbung ein, die auf Zusatz von Essigsäure bläulich wird.

f) Mit essigsaurem Phenylhydrazin und p-Nitrophenylhydrazin erhält man nach kurzem Aufkochen krystallinische Niederschläge, jedoch nicht sehr reichlich.

Dieselben Eigenschaften zeigte das Destillat beim

Versuch 12.

Es waren 25 g Brenztraubensäure (als Kaliumsalz) mit 15 g Hefe 72 Stunden lang vergoren. Das Gärgut reagierte hier schwach alkalisch und wurde diesesmal ohne jeden Zusatz nach Filtration destilliert. Im Destillationsrückstande haben wir optisch-aktive Milchsäure, auf die gefahndet wurde, bisher nicht auffinden können.

Die Vergärung der brenztraubensauren Salze gelingt keineswegs nur mit bestimmten Heferassen. Wir haben 3 Sorten mit völlig gleichem Erfolge verwendet. Zu den Versuchen dienten teils käufliche Hefe, teils besonders gezüchtete Hefen, die wir der Güte des Herrn Prof. Lindner vom Institut für Gärungs-

gewerbe in Berlin verdanken, nämlich eine dunkle untergärige Hefe (vom Institut für Gärungsgewerbe als Hefe K bezeichnet) und eine helle Oberhefe (Hefe A benannt).[1])

Versuch 13.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; mit Oberhefe A nach 22 Stunden 10 ccm CO_2.

Versuch 14.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; mit Unterhefe K nach 22 Stunden 9 ccm CO_2.

Versuch 15.

4%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; mit Oberhefe A, nach 24 Stunden 11 ccm CO_2.

Versuch 16.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; mit Unterhefe K, nach 24 Stunden 11 ccm CO_2.

Zwei selbstverständliche Kontrollen sind nicht unterlassen: einmal die Feststellung, daß brenztraubensaure Salze an sich bei 36 bis 40° auch nicht Spuren von CO_2 entwickeln, und dann, daß (durch Kochen) abgetötete Hefe nicht katalytisch aus brenztraubensauren Salzen Kohlendioxyd abspaltet.

Welches auch die noch eingehend zu erforschenden Produkte der Hefeeinwirkung sind, eines läßt sich schon jetzt mit Sicherheit sagen, daß hier ein Prozeß vorliegt, der von den bisher bekannten Gärungen durch Hefe verschieden ist.

Bei der Gärung des Zuckers handelt es sich um Bildung von Äthylalkohol, bei der durch F. Ehrlichs fundamentale Untersuchungen klargelegten Vergärung der Aminosäuren in Gegenwart von sehr viel Zucker um die Entstehung der verschiedensten Alkohole (bzw. Säuren). In allen bisher bekannten Fällen sind die Prozesse ausnahmslos an die Anwesenheit von Kohlenhydraten geknüpft gewesen. Ist es doch gerade nach Ehrlich die beim Zerfall des Zuckers in Äthylalkohol und CO_2 frei werdende Energie, welche die Hefe zur Assimilierung der zugesetzten stickstoffhaltigen Materialien (Aminosäuren) befähigt, während nach ihm die Aminosäuren bei Zuckerabwesenheit allein überhaupt nicht von Hefe angegriffen

[1]) Eine vierte Hefensorte, Brennerei-Reinhefe M, die wir benutzt, aber noch nicht in Serienversuchen durchgeprüft haben, „vergärt" gleichfalls brenztraubensaure Salze glatt.

werden. Im Falle der Hefeneinwirkung auf Brenztraubensäure handelt es sich jedoch um kein Kohlenhydrat[1]).

Es lag nahe, vorläufig einmal qualitativ jene Substanzen zu prüfen, die notorisch in irgendeinem genetischen Zusammenhange mit Methylglyoxal stehen. Es waren dieses d-Weinsäure, Gärungs-Milchsäure, d, l-Alanin, d, l-Isoserin, d, l-Serin, d, l-Glycerinsäure und l-Cystin. Bei mehreren haben wir Anhaltspunkte für eine Vergärbarkeit in Abwesenheit von Zucker unter gewissen Umständen gefunden. Beim Cystin, dessen Beziehungen zur Brenztraubensäure früher klargelegt sind[2]), scheint die Einwirkung der Hefe durch die Unlöslichkeit der Substanz erschwert zu sein und andrerseits durch den entwickelten Schwefelwasserstoff auch gehemmt zu werden. Immerhin erhielten wir mit der obergärigen Hefe A innerhalb 24 Stunden 4 ccm CO_2, nach 48 Stunden 8,5 ccm reines Kohlendioxyd. Glycerinsaures Kalium sowie K- und Na-Lactat erwiesen sich innerhalb 24 Stunden mit Oberhefe A in zahlreichen Versuchen als recht glatt „gärbar"; Cystin wie glycerinsaures Kalium gerieten mit käuflicher Hefe schwächer, mit Unterhefe K überhaupt nicht in Gärung. Hier zeigten also die verschiedenen Heferassen ein vielleicht diagnostisch verwertbares Wahlvermögen.

Die Prüfung des zweiten Teils der von uns geäußerten Hypothese — wir möchten sie selbstverständlich nur als eine ganz vorläufige betrachten —, die event. Vergärbarkeit des Brenztraubenalkohols (allein oder im Gemisch mit Brenztraubensäure), muß wie die noch ausstehende Aufklärung des Prozesses und die Untersuchung anderer in dieses Gebiet der zuckerfreien Gärungen gehörigen Körper, so namentlich der Lactate, weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

Der Befund, daß nicht zu den Kohlenhydraten (und nicht zu den in Gegenwart von Zucker vergärbaren Aminosäuren) gehörende Substanzen bei der üblichen Anstellung der Gärprobe von Hefe unter massenhafter CO_2-Produktion zerlegt werden, scheint uns schon jetzt einer Mitteilung wert, da er zur vorsichtigen Beurteilung der „Gärproben" auf Zucker mahnt[3]).

[1]) Eine Mitwirkung von Kohlenhydraten der Hefe selbst ist auszuschließen. Denn die Selbstgärung war in Kontrollproben mit den benutzten Hefesorten und Wasser allein minimal, bei der untergärigen Hefe K praktisch gleich Null.

[2]) C. Neuberg, Ber d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3162, 1902.

[3]) Diese Mitteilung ist um so angebrachter, da soeben (im letzten Heft der Zeitschr. f. physiol. Chem.) O. Neubauer und K. Fromherz bei der Vergärung der aromatischen Substanzen Phenylaminoessigsäure und p-Oxyphenylbrenztraubensäure allerdings in Gegenwart von Zucker (nach F. Ehrlich) zu dem Schlusse kommen, daß α-Ketonsäuren ganz allgemein durch Hefe einer alkoholischen Gärung fähig seien. Unsere Befunde mit der Glycerinsäure und den Lactaten zeigen, daß für die „Vergärung ohne Zucker" jedenfalls die Ketosäurenstruktur keine Bedingung ist.

Über die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze nebst dem Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis.

Von

Kohshi Ohta.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 20. Januar 1911.)

Die chemischen Vorgänge, die in tierischen Geweben und Nahrungsmitteln beim Verfaulen und Verschimmeln derselben auftreten, haben seit jeher das Interesse der Biologen erregt. Demzufolge liegen über die Veränderungen der Eiweißkörper bei den genannten Vorgängen bereits viele wichtige Untersuchungen vor. Was indes die Veränderung des Fettes betrifft, so ist darüber unsere Kenntnis leider noch recht dürftig.

Wie aus der Literatur hervorgeht, sah M. Rubner[1]) Butterfett in Bodenerde oder in nicht sterilen Flüssigkeiten erst nach langer Zeit sich zersetzen. Dabei trat nach Rubner die Fettspaltung durch Bakterien in den Vordergrund, und die Fettzersetzung war in geringerem Grade wahrnehmbar. K. Schreiber[2]), der unter Rubners Leitung mit der Reinkultur von den aus dem Boden isolierten Bakterien und Schimmelpilzen experimentierte, konnte Rubners Befund in vollem Umfange bestätigen. Auch nach Schreiber entfaltete sich die fettzehrende Wirkung vorwiegend durch Bakterien. Fast zu gleicher Zeit beobachtete O. Laxa[3]) ebenfalls, daß die Schimmelpilze und Bakterien Fettspaltung bewirken und somit die Acidität des Fettgemisches bedeutend vermehren. Laxa konnte aus Emulsionen des Pilzes eine Lipase isolieren. Das Vorkommen von Lipase in den Schimmelpilzen wurde übrigens schon

---

[1]) M. Rubner, Über Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren im Boden und in Nährflüssigkeiten. Arch. f. Hyg. 38, 67, 1900.

[2]) K. Schreiber, Fettzersetzung durch Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene 41, 328, 1902.

[3]) O. Laxa, Über die Spaltung des Butterfettes durch Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene 41, 119, 1902.

früher von Camus[1]) erwähnt. Ferner beobachtete Bremer[2]) beim Verschimmeln Spaltung von Baumwollesaatöl, Hanus und Stocky[3]) dieselbe von Butterfett. Neuerdings publizierte O. Rahn[4]) eine Abhandlung über Fettzehrung der Schimmelpilze und Bakterien. Nach Rahn sollen die Pilze von Aspergillaceenarten eine starke Fettspaltung hervorrufen. Bei einer gewissen Bakterie α soll das Fettspaltungs- und Fettzersetzungsvermögen noch viel stärker sein. Hiernach beziehen sich die bisherigen Untersuchungen hauptsächlich auf die fettspaltenden Wirkungen der Schimmelpilze und Bakterien. Über die fettzehrenden Wirkungen derselben sind indessen die bis jetzt vorliegenden zahlenmäßigen Angaben ganz ungenügend.

Nun hat hierüber M. Kumagawa gelegentlich bei der Ausarbeitung seiner Fettbestimmungsmethode[5]) eine sehr interessante Beobachtung gemacht. Zu dem Zwecke der vergleichenden Untersuchungen verschiedener Fettbestimmungsmethoden wog Kumagawa im Dezember 1905 von frisch zubereitetem Rindfleischpulver 100 Proben von je 5,0 g hintereinander. Der Gehalt der einzelnen Proben an hohen Fettsäuren wurde jedoch nach seiner Verseifungsmethode im Mittel von 3 Einzelproben zu 0,358 g festgestellt. Während die Hauptproben im Vakuumapparat verschlossen aufbewahrt wurden, blieben die überschüssigen Proben in Bechergläsern einfach mit Papier bedeckt im Arbeitszimmer stehen. Gegen die Sommerperiode 1906 trat eine Verschimmelung an der Oberfläche auf, die mit der Zeit bedeutend an Intensität zunahm. Kumagawa bestimmte in großen Zeitintervallen den Fettgehalt einiger Proben und fand im Laufe der Zeit eine bedeutende Abnahme der hohen Fettsäuren. Die Probe 1, die am 13. Juli 1906 untersucht wurde, enthielt 0,328 g hoher Fettsäuren gegenüber 0,358 g als anfänglichem Wert. Die Abnahme betrug 8,5%. Die Probe 2, am 28. September 1906 untersucht, enthielt nur 0,097 g in toto.

---

[1]) Camus, Compt. rend. Soc. Biol. 49, 192 u. 230, 1897.

[2]) Bremer, Die fettzersetzenden Organismen in Nahrungs- und Futtermitteln. Diss., Münster 1902, zitiert nach Lafarschem Handb. d. techn. Mykologie 4, 253, 1907.

[3]) Hanus und Stocky, Über die chemische Einwirkung der Schimmelpilze auf Butter. Zeitschr. f. Unters. von Nahrungs- u. Genußmitteln 4, 606, 1900.

[4]) O. Rahn, Die Zersetzung der Fette. Centralbl. f. Bakt., Paras. und Infekt. II. Abt., 15, 53 u. 422, 1906.

[5]) M. Kumagawa und K. Suto, diese Zeitschr. 8, 272, 1908.

Die Abnahme betrug demnach rund 73%. Die Probe 3, am 8. Januar 1908 untersucht, enthielt nur noch 0,072 g Fettsäuren. Die Abnahme betrug hier 80%. Es blieben sonach bei dieser Probe nur noch 20% der hohen Fettsäuren unangegriffen zurück.

Diese wichtige Beobachtung übergab mir Herr Professor M. Kumagawa bereitwillig zur Publikation und veranlaßte mich zur weiteren Erforschung dieses sehr interessanten Themas. Obzwar es nach diesem Ergebnis uns ganz unzweifelhaft erschien, daß das Agens, das die Fettsäuren zum großen Teil zum Schwund gebracht hatte, in der Tat die Schimmelpilze sind, so blieb doch noch die Möglichkeit offen, daß sich auch Bakterien bei dem Prozesse mitbeteiligt hatten. Ganz ausgeschlossen ist ferner die Möglichkeit auch nicht, daß Luft, Licht und Wärme an sich die Hauptursache der Oxydation sein könnten, weil die Beobachtungszeit sich sehr in die Länge gezogen hat. Es erschien uns ferner auch wünschenswert, festzustellen, welche Arten von Schimmelpilzen denn die Wirkung am kräftigsten entfalten. Um diesen Fragen etwas näher zu treten, habe ich unter Leitung von Herrn Professor M. Kumagawa folgende Untersuchungen ausgeführt.

Zunächst habe ich das Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis untersucht. Selbstverständlich wurden alle Fettbestimmungen[1]) nach Kumagawa-Suto ausgeführt.

I. Das Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis.

Wie erwähnt, haben Laxa und Schreiber einige Bakterien aus dem Boden isoliert und sind durch Züchtung derselben im fetthaltigen Nährsubstrate zu dem Resultate gelangt, daß dieselben eine Fettspaltung sowie Fettzehrung hervorrufen. Sie haben indessen den Ätherextrakt einfach als Fett angenommen. Ich wollte zuerst sehen, wie sich das Organfett gegen natür-

[1]) Es ist mir ganz unbegreiflich, daß W. Glikin im neu erschienenen Handbuch d. Biochemie von C. Oppenheimer von den Fettbestimmungsmethoden nur einige von Bogdanow schon als minderwertig zurückgewiesene Methoden zitiert und von der Kumagawa-Sutoschen Methode nichts erwähnt, obwohl Glikin die Kumagawa-Sutosche Abhandlung wohl bekannt sein muß, weil Glikin selber die Arbeit von Kumagawa-Suto im Biochem. Centralbl. (7, 244, 1908) referiert hat.

liche Fäulnis verhält. Zu dem Zwecke habe ich frische Pferdeleber mit der Hackmaschine zu feinem Brei zerhackt und gleichmäßig durchgemischt. Je 20 g davon werden in Glasflaschen von 100 ccm Rauminhalt genau abgewogen. Einige Proben wurden zur Kontrolle direkt nach Kumagawa-Suto verseift. Andere Proben sind in 2 Reihen geteilt. Die eine Reihe a wurde unter Zusatz von 10 ccm Wasser und die andere Reihe b ohne Wasserzusatz einfach unter dem Abzug der natürlichen Fäulnis überlassen. Je 2 bis 3 Proben wurden nach verschiedener Fäulnisdauer auf ihren Fettgehalt untersucht. Da es Sommer war, trat bald Fäulnis ein. Bei a wurde der Inhalt bald dünnbreiig und der Fäulnisgeruch immer stärker. Die obenstehende Flüssigkeit färbte sich dabei allmählich tiefbraun und zuletzt fast schwarz, der untere Bodensatz aus Gewebsfetzen blieb aber rötlich bis grau-weißlich. Bei einigen Proben entwickelten sich nach 1 Monat Madenwürmer. Die Reihe b ohne Wasserzusatz begann nach einigen Tagen an der Oberfläche zu verschimmeln, indem hie und da fleckenweise bräunlicher, grüner und weißer Schimmel auftrat. Diese Kolonien verwuchsen nach einiger Zeit miteinander und bedeckten die ganze Oberfläche, die dann von feucht glänzenden, dunkelbraunen Schimmeln dicht membranös bedeckt ist.

In der Innenschicht blieb indessen die rötliche Färbung erhalten. Der Brei wurde allmählich braun und neigte zur Verflüssigung, so daß der ganze Inhalt nach 1 Monate nahezu dünnbreiig aussah. Unter starkem Fäulnisgeruch entwickelten sich auch bei dieser Reihe nach etwa 20 Tagen Madenwürmer.

Die Resultate sind in folgenden Tabellen verzeichnet.

Tabelle I.

Petrolätherextrakt der Pferdeleber bei Fäulnis nach verschiedener Dauer.

A. Fettgehalt der Leber vor dem Versuche.

Versuchs-Nr	Menge des Organbreies g	Gereinigtes Petrolätherextrakt g	%	Farbe	Hohe Fettsäuren g	%	Cholesterin g	%
1	20,0	0,7926	3,963	gelblich	0,7398	3,699	0,0528	0,264
2	20,0	0,7730	3,865	„	0,7214	3,607	0,0516	0,254
Mittel	20,0	0,7828	3,914		0,7306	3,653	0,0522	0,261

B. Fäulnis mit Wasserzusatz.

Versuchs-Nr.	Fäulnisdauer Tage	Menge des Organbreies g	Petrolätherextrakt (Hohe Fettsäuren + Cholesterin) g	%	Farbe
1	5	20,0	0,8048	4,024	gelb
2		20,0	0,7666	3,833	gelblich
3		20,0	0,8060	4,030	gelb
1	10	20,0	0,8700	4,350	bräunlich
2		20,0	0,8618	4,309	„
3		20,0	0,8640	4,320	„
1	20	20,0	0,8588	4,294	braun
2		20,0	0,8460	4,230	bräunlich
3		20,0	0,9292	4,646	braun
1	30	20,0	0,9078	4,539	tiefbraun
2		20,0	0,9566	4,283	schwärzlich
3		20,0	0,9644	4,822	„
1	40	20,0	0,7124	3,562	bräunlich
2		20,0	0,8430	4,215	braun
1	50	20,0	0,8886	4,443	braun
2		20,0	0,8546	4,273	bräunlich
3		20,0	0,9620	4,810	tiefbraun
1	60	20,0	0,8666	4,333	tiefbraun
2		20,0	0,8500	4,250	„
3		20,0	0,8592	4,296	„

C. Fäulnis ohne Wasserzusatz.

Versuchs-Nr.	Fäulnisdauer Tage	Menge des Organbreies g	Petrolätherextrakt (Hohe Fettsäuren + Cholesterin) g	%	Farbe
1	5	20,0	0,7878	3,939	gelblich
2		20,0	0,8264	4,132	gelb
1	10	20,0	0,8566	4,283	bräunlich
2		20,0	0,8546	4,273	„
3		20,0	0,8526	4,263	„
1	20	20,0	0,7982	3,991	braun
2		20,0	0,8980	4,490	bräunlich
3		20,0	0,8816	4,408	„
1	30	20,0	0,9156	4,528	braun
2		20,0	0,9838	4,919	„
3		20,0	0,8588	4,294	„
1	40	20,0	0,8714	4,357	braun
2		20,0	0,9426	4,713	schwärzlich
3		20,0	0,9480	4,740	„
1	50	20,0	1,0436	5,218	tiefbraun
2		20,0	0,9622	4,811	„
1	60	20,0	1,3828	6,914	tiefbraun

Wie in der Tabelle verzeichnet, nimmt die Quantität der Petrolätherextrakte im allgemeinen mit der Dauer der Fäulnis bedeutend zu. Die Zunahme beträgt in den einzelnen Proben über 20%. Allerdings sind auch größere Schwankungen vorhanden. Wenn man aus diesem Befunde allein das Verhalten des Gewebsfettes gegen natürliche Fäulnis beurteilt, so müßte man unbedingt den Schluß ziehen, daß das Fett entsprechend der Steigerung der Petrolätherextrakte sich mit der Fäulnisdauer aus anderen Verbindungen neubildet. Wenn man indessen die Beschaffenheit und die Natur der Petrolätherextrakte der stark verfaulten Pferdeleber etwas genauer betrachtet, so sind dieselben von denjenigen ganz verschieden, die man bis jetzt von verschiedenen Geweben und Nahrungsmitteln bei der Verseifung gewonnen hat. Vor allem zeichnet sich das Petroläther extrakt der stark verfaulten Pferdeleber durch eine braunschwarze Farbe aus, deren Intensität mit der Fäulnisdauer fast parallel zunimmt, während das Petrolätherextrakt der frischen Gewebe nach der Verseifung nur blaßgelb gefärbt ist und aus reinen Fettsäuren mit etwas Cholesterin besteht. Da die Leber Bestandteile von Galle und Blut enthält, so könnten hieraus nach vorgeschrittener Fäulnis und durch darauf folgende Verseifung wohl solche Zersetzungsprodukte entstehen, die entweder an sich schon petrolätherlöslich sind oder durch gegenseitige Wirkung verschiedener Produkte sich im Petroläther gelöst vorfinden. Aus dieser Vermutung heraus habe ich vergeblich verschiedene Lösungsmittel durchprobiert, um aus dem stark gefärbten Petrolätherextrakte hohe Fettsäuren in reinem Zustande zu isolieren. Da die Schwierigkeiten nicht leicht zu überwinden schienen, so müßte ich mich zurzeit damit begnügen, einige Beimengungen im gefärbten Petrolätherextrakte nachzuweisen. Der erwärmte Wasserauszug des Petrolätherextraktes färbte sich mit Millonschem Reagens rot (aromatische Oxysäuren) und mit Kaliumnitrit und konzentrierter Schwefelsäure rot (Indol). Durch Schmelzen des Petrolätherextraktes mit Salpetermischung wurde die Gegenwart von Phosphor und Schwefel nachgewiesen. Durch Veraschen des Extraktes in der Platinschale konnte sogar die Gegenwart von Eisen, wenn auch in geringer Menge, nachgewiesen werden. Die Prüfung auf Gallenfarbstoff und Gallensäuren im Extrakte ist

negativ ausgefallen. Andere Untersuchungen wurden nicht gemacht.

Aus diesen Untersuchungen geht so viel mit Sicherheit hervor, daß das Petrolätherextrakt der stark verfaulten Leber nach der Verseifung bedeutende Mengen von Verunreinigungen enthält. Demnach ist der Schluß nicht gestattet, daß die Fäulnis den Fettgehalt der Leber vermehrt, obwohl die Menge des Petrolätherextraktes nach der Verseifung bedeutend vermehrt ist. Demnach ist selbst die Verseifungsmethode nach Kumagawa-Suto nicht imstande, den Fettgehalt der stark verfaulten Leber festzustellen. Wenn man wie früher das Ätherextrakt einfach als Fett angenommen hätte, so hätte man in solchen Fällen einen wohl noch größeren Fehler begangen. Die Frage, ob auch andere Gewebe oder Organe nach der natürlichen Fäulnis ganz ebenso wie die Leber für die Fettbestimmung unzugänglich werden, läßt sich ohne diesbezüglich besonders angestellte Experimente nicht beantworten. Mir scheint indes, daß diese unangenehme Eigenschaft fast spezifisch für die Leber zur Geltung kommt, weil das Petrolätherextrakt selbst der ganz frischen Leber bei der Verseifung stets etwas stärker gefärbt ist als dasjenige der anderen Organe, und das Schwarzwerden der Fäulnisprodukte bei anderen Organen und Geweben mir bis jetzt nicht bekannt ist. Die Vermehrung der gefärbten Petrolätherextrakte bei diesem Versuche darf unter keinen Umständen auf die Vermehrung der Fettmenge selbst zurückgeführt werden, weil besonders bei der Versuchsreihe b ohne Wasserzusatz die Verschimmelung mehr in den Vordergrund trat, als die Fäulnis durch Saprophyten. Bei der Verschimmelung findet im Gegenteil Fettzehrung statt, wie dieselbe Kumawaga schon nachgewiesen hat und wie ich bestätigen kann.

Um das Verhalten des Leberfettes gegen Fäulnis einwandfrei festzustellen, kommt somit nur das Verfahren zur Geltung, wonach man die Reinkultur der einzelnen Saprophyten in steriler Leber wachsen läßt und den Fettgehalt vor und nach der Kultur vergleicht. Diese Prüfung ist aus äußeren Gründen ausgeblieben. Im folgenden habe ich zunächst die Wirkung der Schimmelpilze gegen Organfett in Betracht gezogen.

II. Die Wirkungen der Schimmelpilze auf das Organfett.

Wie wir eben bei der Fäulnis gesehen haben, gibt uns die Prüfung der vorgelegten Frage mit dem Gemenge von Bakterien und Schimmelpilzen keinen richtigen Aufschluß. Zur definitiven Entscheidung derselben ist es durchaus nötig, daß man mit Reinkulturen der Schimmelpilze arbeitet und den Fettgehalt des Organpulvers vor und nach der Aussaat der Pilze vergleicht. Hierzu ist in erster Linie eine Isolierung der Schimmelpilze notwendig.

Isolierung der Schimmelpilze.

Etwa 9 cm weite, vorher sterilisierte Petrischalen mit Gelatinenährboden wurden 1 Stunde lang offen im Arbeitszimmer belassen, dann bedeckt bei 22° C im Brutschrank aufbewahrt. Genau ebenso wurde eine Probe von lufttrocknem Pferdeleberpulver von etwa 5 g mit einigen Kubikzentimetern Wasser befeuchtet und vorher durch Dampfsterilisation keimfrei gemacht, in den Petrischalen behandelt. Von solchen Versuchen wurden mehrere Proben hintereinander angestellt. Nach etwa 1 Woche entwickelten sich an der Oberfläche der beiden Proben zahlreiche Kolonien. Hieraus wurden einzelne Kolonien durch Stichkultur in Gelatinenährboden übergeimpft. Durch wiederholte Versuche habe ich aus der Luft meines Arbeitszimmers mehrere Arten Schimmelpilze in Reinkultur erhalten, wovon 5 Arten zu den folgenden Untersuchungen ausgewählt wurden. Diese 5 Pilzarten sind von dem erfahrenen Mykologen K. Saito identifiziert worden:

1. Cladosporium herbarum,
2. Penicillium glaucum,
3. Aspergillus glaucus,
4. Aspergillus nidulans,
5. Actinomucor repens, Schostakowitsch.

Die ersten 4 Arten sind ganz allgemeine Schimmelpilze, die überall vorkommen. Saito[1]) konnte in verschiedenen Jahreszeiten und in verschiedenen Orten Tokios bis jetzt etwa 50 Arten Schimmelpilze isolieren. Hierbei hat Saito die obgenannten 4 Arten nirgends vermißt. Dagegen soll Actinomucor repens[2]) äußerst selten vorkommen. Nach langjähriger mykologischer Erfahrung von K. Saito soll mein Fall der dritte sein.

[1]) K. Saito, Die athmosphärischen Pilzkeime. Journ. of the science college, Imper. Univ. Tokio, Japan, 18, Art. 5.

[2]) Schostakowitsch, Actinomucor repens, n. Gen. n. sp. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 16, 155, 1898.

Fettverlust bei der Sterilisation des Nährsubstrates.

Ich habe auch bei diesem Versuche lufttrockenes Pferdeleberpulver zum Substrate benutzt. Es war nötig, das Substrat vor dem Überimpfen der Pilze durch Dampfsterilisation keimfrei zu machen. Da ich es für möglich hielt, daß ein Fettverlust durch diese Operation stattfinden könnte, so habe ich folgende Versuche angestellt. Je 1 bis 3 g lufttrockenes Leberpulver wurde in Erlenmeyer-Kolben gebracht, 5 ccm Wasser zugesetzt, mit Watte verschlossen und 2 Tage hintereinander je 1stündlich im Dampfbad bei 100° C sterilisiert. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß hierdurch vollkommene Abtötung der Keime erzielt worden ist. Die Fettbestimmungen vor und nach dieser Sterilisation haben, wie erwähnt, eine geringe Oxydation des Fettes ergeben, wie die nachstehende Tabelle dies erläutert.

Tabelle IIa.

Fettgehalt des Pferdeleberpulvers vor und nach der Sterilisation.

	Versuchs-Nr.	Menge des Organpulvers g	Petroläther-extrakt g	Petroläther-extrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
Vor der Sterilisat.	1	1,4962	0,1634	10,91	0,1524	10,18	0,0110	0,734
	2	1,4076	0,1540	10,94	0,1434	10,21	0,0104	0,739
	3	2,6758	0,2880	10,78	0,2676	10,00	0,0210	0,783
	Mittel	1,8599	0,2020	10,88	0,1878	10,13	0,0141	0,762
Nach der Sterilisation	1	2,2656	0,2440	10,76	0,2246	9,913	0,0194	0,857
	2	1,9594	0,2050	10,47	0,1936	9,863	0,0116	0,592
	3	2,8352	0,2980	10,51	0,2787	9,881	0,0193	0,681
	4	2,2142	0,2354	10,62	0,2178	9,817	0,0176	0,795
	Mittel	2,3186	0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731

Tabelle IIb.

Übersichtstabelle von Tabelle IIa.

Vergleich des Organfettes vor und nach der Sterilisation.

	Petrolätherextr. %	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin %
Vor der Sterilisation	10,88 (100)	10,13 (100)	0,752 (100)
Nach der Sterilisation	10,59 (97,3)	9,869 (97,5)	0,731 (97,2)
Differenz in Prozent.	− 2,7	− 2,5	− 2,8

Wie die Tabelle angibt, hat die Sterilisation zu einem Fettverluste von 2,5 bis 2,7 % geführt. In den folgenden Ver-

suchen habe ich deshalb den Fettgehalt des Leberpulvers nach der Sterilisation als den Normalwert zugrunde gelegt. Da die Größe der Verluste wesentlich von der Dauer der Sterilisation und zugesetzten Wassermenge abhängig ist, so habe ich in den Hauptversuchen alle Bedingungen möglichst gleichmäßig gestaltet.

Versuchsreihe 1.

Vergleichende Untersuchungen der fettzehrenden Wirkungen von 5 Schimmelpilzarten.

Wie erwähnt, wurden 1 bis 3 g Organpulver in Erlenmeyer-Kolben genau abgewogen und unter Zusatz von 5 ccm Wasser 2 Tage hintereinander je 1 Stunde mit Dampf sterilisiert. Darauf wurden die Pilzrasen eingeimpft. Hierzu wurde von den erwähnten Reinkulturen die Rasenoberfläche mit einer Platinöse abgestrichen und dieselbe in 10 ccm steriles Wasser hineingebracht. Nach der Durchmischung derselben wurden hiervon 0,2 ccm Sporenaufschwemmung mittels Pipette in die Erlenmeyer-Flaschen gegeben, noch 5 ccm Wasser zugesetzt und mit Watteprop verschlossen. Selbstverständlich geschah alles unter streng aseptischen Kautelen. Die so hergestellten Proben blieben im Winter bei 22° C im Brutofen und im Sommer einfach im Zimmer liegen. Nach einigen Tagen sieht man die anfangs ganz zerstreut und fleckenweise bemerkbaren Pilzrasen sich rasch entwickeln und bald miteinander konfluieren, so daß vor allem bei Actinomucor repens nach etwa 2 Wochen der Innenraum der etwa 150 ccm fassenden Flaschen fast mit Pilzrasen voll gefüllt werden. Daß die Rasen rein und einstämmig sind, ließ sich sowohl makroskopisch wie mikroskopisch leicht feststellen. Alle Proben wurden nach etwa 1 Monate durch Zusatz von Verseifungslauge gleichzeitig abgetötet und weiter nach Kumagawa-Suto auf ihren Fettgehalt untersucht. Die Kontrollprobe, die nach der Sterilisation ohne Pilzimpfung aufbewahrt wurde, blieb dauernd ganz steril. Die Resultate der Fettbestimmungen in den verschiedenen Pilzarten sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Tabelle IIIa.

Fettgehalt des Pferdeleberpulvers nach der Züchtung verschiedener Schimmelpilze.

Art der geimpften Schimmelpilze	Menge des Organpulvers g	Petroläther-extrakt g	Petroläther-extrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
Vor dem Versuche . .	2,3186	0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
Cladosporium herbarum	2,3576	0,2332	9,889	0,2112	8,794	0,0210	0,891
Penicillium glaucum .	3,2048	0,3130	9,757	0,2800	8,742	0,0330	1,030
Aspergillus glaucus . .	2,0906	0,1738	8,313	0,1586	7,590	0,0152	0,727
Aspergillus nidulans . .	2,2808	0,1824	7,998	0,1692	7,418	0,0132	0,597
Actinomucor repens . .	2,1362	0,1148	5,375	0,1002	4,690	0,0146	0,684

Tabelle IIIb.

Die Fettabnahme des Organpulvers nach der Züchtung der Schimmelpilze.

Art der geimpften Schimmelpilze	Petrolätherextrakt %		Hohe Fettsäuren %	
	Gefunden	Verlust	Gefunden	Verlust
Vor dem Versuche	10,59	—	9,869	—
Cladosporium herbarum . . .	9,889	6,62	8,794	10,91
Penicillium glaucum	9,757	7,87	8,742	11,42
Aspergillus glaucus	8,313	21,50	7,590	23,12
Aspergillus nidulans	7,998	24,48	7,418	24,84
Actinomucor repens	5,375	49,24	4,690	52,48

Die Petrolätherextrakte sind ganz schwach gelblich gefärbt und bestehen aus reinen Fettsäuren mit etwas Cholesterin. Was die Wirkungen der Schimmelpilze auf das Organfett betrifft, so haben alle von mir untersuchten 5 Pilzarten in beträchtlichem Grade Organfett zum Schwund gebracht. Die Intensität der fettzehrenden Wirkung ist indessen, wie n der Tabelle verzeichnet, je nach den Pilzarten großen Schwankungen unterworfen. Die Wirkungen von Cladosporium herbarum und Penicillium glaucum waren in dieser Hinsicht am schwächsten. Sie haben rund 11% der Fettsäuren verzehrt. Die beiden Aspergillusarten haben dagegen 23 bis 25% des Fettes verzehrt. Am kräftigsten war die Wirkung von Actinomucor repens. Derselbe hat 52,5%, also über die Hälfte des Gesamtfettes zum Schwund gebracht.

Um diesen Schluß aufrecht zu erhalten, muß betreffs der Untersuchungsmethode noch folgender Punkt berücksichtigt werden. Bei der Ausführung der Fettbestimmungsmethode nach Kumagawa-Suto entsteht bekanntlich bei der Überneutralisation der Verseifungsgemische mit Salzsäure ein flockiger Niederschlag in ganz winziger Menge. Der Verdacht, daß eine geringe Menge hoher Fettsäuren in diesen Flocken eingeschlossen der Bestimmung entgehen möge, kann, wie in der Vorschrift genau angegeben ist, leicht dadurch entkräftet werden, daß dieselben noch einmal in wenig Alkali aufgelöst, mit Äther geschüttelt und dann wieder angesäuert werden. Bei der Verseifung der mit Pilzrasen durchsetzten Organpulver und darauffolgender Überneutralisation mit Säure entsteht nun der Niederschlag in viel größerer Menge als sonst. Derselbe löst sich weder in Lauge noch in Säure auf. Bei der mikroskopischen Untersuchung hat sich ergeben, daß dieser Niederschlag nichts anderes als ein Konglomerat von Schimmelpilzrasen ist. Wegen der Größe des Niederschlages ist hier die Möglichkeit wohl zu beachten, daß derselbe einen Teil der hohen Fettsäuren in sich einschließt und an den Äther nicht abgibt, wodurch ein scheinbarer Fettverlust verursacht wird. Wenn auch dieser Scheinverlust unmöglich groß sein kann, so habe ich diesen Wert besonders untersucht. Hierzu habe ich sämtliche Pilzrasenniederschläge von 5 Proben auf entfettetem Filterpapier vereinigt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde im Heißextraktor

nach Kumagawa-Suto 5 Stunden lang mit siedendem absolutem Alkohol extrahiert. Durch Verseifung des Alkoholextraktes haben sich für 5 Proben zusammen folgende Werte ergeben:

Petrolätherextrakt . . .	0,0998 g
Hohe Fettsäuren . . .	0,0888 g
Cholesterin	0,0110 g

Hieraus berechnet sich das Petrolätherextrakt für eine Probe zu rund 0,02 g = 7% des Gesamtfettes. Die Frage, ob diese geringe Fettmenge einfach mechanisch mitgerissen ist, oder ob dieselbe vielmehr zu den physiologischen Bestandteilen der Pilzleiber gehört, lasse ich zurzeit dahingestellt.

Wenn demnach derjenige Teil hoher Fettsäuren, der in den Pilzrasen eingeschlossen der Bestimmung entgeht, den wahren Fettverlust infolge der Fettzehrung durch Schimmelpilze bei weitem nicht decken kann, so ist jener Wert doch immerhin ansehnlich, so daß derselbe durchaus nicht vernachlässigt werden darf. Da in dieser Versuchsreihe auf dieses Verhalten keine genügende Rücksicht genommen war, so habe ich noch folgende Versuchsreihe angestellt, in der auch noch andere Momente mit genügender Exaktheit berücksichtigt worden sind.

Versuchsreihe 2.

Wiederholte Untersuchungen von 5 Schimmelpilzarten auf ihre fettzehrenden Wirkungen.

Alle Versuchsanordnungen sind genau ebenso wie bei der Versuchsreihe 1 getroffen. Für alle einzelnen Bestimmungen sind außerdem die Pilzniederschläge gesondert mit siedendem Alkohol 5 Stunden lang extrahiert und die daraus durch Verseifung gewonnenen Fettsäuren in der Tabelle als b bezeichnet, während die Hauptwerte als a bezeichnet wurden. Alle hierzu benutzten sogenannten entfetteten Filterpapiere von Schleicher-Schüll sowie entfettete Watte sind nochmals im Heißextraktor nach Kumagawa-Suto durch 5stündige Extraktion mit siedendem Alkohol von jeglichem Lipoid vollständig befreit worden, was, wie ersichtlich, sehr umständlich und zeitraubend war. Auch bei dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung der üppig gedeihenden Pilzrasen nach 1monatiger Wachstumsdauer durch Zusatz von Verseifungslauge gleichzeitig unterbrochen. Die gewonnenen Resultate sind in der folgenden Tabelle IVa und IVb verzeichnet.

Wie die Tabelle angibt, stimmen die Resultate dieser nach allen Richtungen hin als einwandfrei zu erachtenden Versuchsreihe mit denjenigen der vorhergehenden im großen und ganzen gut überein. Nur sind die fettzehrenden Wirkungen von Penicillium und Aspergillus etwas schwächer ausgefallen als diejenigen bei der Versuchsreihe 1. Daß Actinomucor repens unter 5 Pilzarten am stärksten fettzehrende Wirkung besitzt, ist auch durch diese Versuche außer Zweifel gestellt. Derselbe hat bei diesem Versuche sogar 52 bis 64% des Gesamtfettes zum Schwund gebracht. Somit ist die eingangs erwähnte Beobachtung von

Kumagawa durch diese Versuchsreihe vollständig bestätigt worden. Die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze sind indessen je nach den Pilzarten sehr verschieden.

Tabelle IVa.

Fettzehrung bei der Züchtung verschiedener Schimmelpilze in dem Organpulver.

Nummer	Geimpfter Schimmelpilz	Menge des Organpulvers g		Petrolätherextrakt g	Petrolätherextrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
	Vor dem Versuche	2,3186		0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
1	Cladosporium herbarum	2,1904	a	0 1968	8,986	0,1790	8.173	0.0178	0.813
			b	0,0088	0,4018	0.0068	0.310	0 0020	0,091
			a+b	0,2056	9,388	0,1858	8,484	0,0198	0,904
2	Penicillium glaucum	3,1694	a	0.3002	9.472	0,2734	8 626	0 0268	0,846
			b	0,0210	0,6656	0,0198	0.6277	0 0012	0,038
			a+b	0,3212	10,14	0,2932	9,254	0,0280	0,884
3	Penicillium glaucum	2,5900	a	0 2390	9,228	0,2150	8.301	0.0240	0.927
			b	0,0238	0,9189	0.0212	0 8185	0 0026	0,100
			a+b	0,2628	10,15	0,2362	9.120	0,0266	1,027
4	Aspergillus glaucus	3,2914	a	0,2848	8.646	0.2564	7,789	0,0282	0,857
			b	0,0120	0.3646	0.0096	0,2917	0,0024	0.073
			a+b	0,2968	9,011	0,2660	8,081	0,0306	0,930
5	Aspergillus glaucus	3,3702	a	0,2930	8,696	0 2637	7.826	0 0293	0.870
			b	0.0156	0,4629	0.0130	0 3858	0.0026	0.077
			a+b	0,3086	9,159	0,2767	8,212	0,0319	0,947
6	Aspergillus nidulans	2,6526	a	0,1928	7.269	0,1738	6 552	0 0190	0,716
			b	0,0386	1,455	0.0346	1.304	0 0040	0.151
			a+b	0,2314	8,724	0,2084	7,856	0.0230	0,867
7	Aspergillus nidulans	2,7366	a	0,2192	8,009	0.1982	7.242	0.0210	0.767
			b	0,0310	1,133	0,0274	1.001	0 0036	0.132
			a+b	0,2502	9,142	0,2256	8.243	0,0246	0,899
8	Actinomucor repens	3,0518	a	0,1573	5.154	0.1329	4,354	0,0244	0,800
			b	0.0167	0,5473	0.0127	0.4162	0.0040	0.131
			a+b	0.1740	5,701	0,1456	4,770	0 0284	0,931
9	Actinomucor repens	1,7904	a	0,0653	3,647	0 0473	2.634	0.0180	1,013
			b	0.0211	1,179	0 0154	0.8601	0,0057	0,318
			a+b	0,0864	4.826	0,0627	3,494	0,0237	1,331

Bei den bisherigen Versuchen ist jedoch die Wachstumsdauer der Pilze auf 1 Monat verlängert. Augenscheinlich vermehren sich die Pilzrasen nach etwa 2 Wochen nicht mehr. Es war deshalb interessant, zu sehen, ob die fettzehrenden Wirkungen der Pilze in dem Momente schon ihre maximale Grenze erreichen, wo ihr Wachstum anscheinend stillsteht. Zu

Tabelle IVb.

Übersichtstabelle von Tabelle IVa.

Fettzehrung verschiedener Schimmelpilze.

Nummer	Geimpfter Schimmelpilz		Petrolätherextrakt % Gefunden	Petrolätherextrakt % Verlust	Hohe Fettsäuren % Gefunden	Hohe Fettsäuren % Verlust
	Vor dem Versuche . .		10,59	—	9,869	—
1	Cladosporium herbarum	a	8,986		8,173	
		b	0,402		0,310	
		a+b	9,388	11,3	8,484	14,1
2	Penicillium glaucum .	a	9,472		8,626	
		b	0,666		0,628	
		a+b	10,14	4,3	9,254	6,2
3	Penicillium glaucum .	a	9,228		8,301	
		b	0,919		8,819	
		a+b	10,15	4,2	9,120	7,6
4	Aspergillus glaucus . .	a	8,646		7,789	
		b	0,365		0,292	
		a+b	9,011	14,9	8,081	18,1
5	Aspergillus glaucus . .	a	8,696		7,826	
		b	0,463		0,386	
		a+b	9,159	13,5	8,212	16,8
6	Aspergillus nidulans .	a	7,269		6,552	
		b	1,455		1,304	
		a+b	8,724	17,6	7,856	20,4
7	Aspergillus nidulans .	a	8,009		7,242	
		b	1,133		1,001	
		a+b	9,142	13,7	8,243	16,5
8	Actinomucor repens .	a	5,154		4,354	
		b	0,547		0,416	
		a+b	5,701	46,2	4,770	51,7
9	Actinomucor repens .	a	3,647		2,634	
		b	1,179		0,860	
		a+b	4,826	54,4	3,494	64,6

dem Zwecke habe ich mit Actinomucor repens noch folgende Versuche angestellt.

Versuchsreihe 3.

Fettzehrende Wirkung von Actinomucor repens nach kürzerer Wachstumsdauer.

Hierzu habe ich 2 Arten von Versuchen angestellt. Bei A (Bezeichnung der Tabelle) habe ich wie sonst als Nährboden Leberpulver benutzt und die Wachstumsdauer teils auf 2 Wochen, teils auf 3 Wochen beschränkt. Bei B habe ich als Nährsubstrat Reiskleie benutzt und die Wachstumsdauer auf 2 Wochen beschränkt. Bei B habe ich ferner

Fettbestimmungen der Reiskleie vor und nach der Kultur durch Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung ausgeführt.[1]) Sonst sind auch diese Versuche bis auf die Einzelheiten genau ebenso ausgeführt wie die vorhergehenden. Die Resultate sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle Va.

A. Fettzehrung von Actinomucor repens bei Züchtung in dem Organpulver (Pferdeleber).

Versuchs-Nr.	Menge d. Organpulvers g	Wachstumsdauer		Petroläther-extrakt g	Petroläther-extrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
Vor d. Vers.	2,3186	0		0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
1	1,9328	2 Woch.	a	0,0906	4,687	0,0774	4,004	0,0132	0,683
			b	0,0292	1,511	0,0250	1,294	0,0042	0,217
			a+b	0,1198	6,198	0,1024	5,298	0,0174	0,900
2	1,2300	3 Woch.	a	0,0327	2,659	0,0287	2,334	0,0040	0,325
			b	0,0212	1,724	0,0168	1,366	0,0044	0,358
			a+b	0,0539	4,383	0,0455	3,700	0,0084	0,683
3	1,6540		a	0,0724	4,376	0,0617	3,730	0,0107	0,646
			b	0,0168	1,016	0,0130	0,7863	0,0038	0,230
			a+b	0,0892	5,392	0,0747	4,516	0,0145	0,876

B. Fettzehrung von Actinomucor repens bei Züchtung in der Reiskleie.

	Nr.	Menge d. Reiskleie g	Wachstumsdauer	Petroläther-extrakt g	Petroläther-extrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
Vor d. Vers.	1	1,8734	0	0,2514	13,42	0,2368	12,59	0,0156	0,822
	2	2,1162		0,2848	13,46	0,2644	12,49	0,0204	0,964
	Mittel	1,9948		0,2681	13,44	0,2506	12,54	0,0180	0,893
Nach d. Vers.	1	1,2652	2 Woch.	0,0998	7,868	0,0810	6,397	0,0188	1,419
	2	1,7556		0,1436	8,179	0,1192	6,790	0,0244	1,390

[1]) Zuerst habe ich für die Fettbestimmung der Kleie ebenfalls die direkte Verseifungsmethode versucht. Indessen löst sich die Kleiemasse bei der Verseifung nicht vollständig, und bei der Überneutralisation mit Salzsäure quillt die Masse gallertig auf. Hierdurch wird die Extraktion mit Äther sehr erschwert; deshalb habe ich hier die zweite Methode von Kumagawa-Suto, nämlich Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung, vorgezogen. Bei allen kohlenhydratreichen pflanzlichen Materialien scheint die letztere Methode der direkten Verseifungsmethode überlegen zu sein.

Tabelle V b.

(Übersichtstabelle von Tabelle V a.)

Fettzehrung von Actinomucor repens.

Versuchs-Nr.		Versuchs-material	Wachstums-dauer		Petroläther-extrakt Gefund. %	Verlust %	Hohe Fettsäuren Gefund. %	Verlust %
A.	Vor d. Vers.	Leberpulver	0		10,59	—	9,869	—
	1	„	2 Woch.	a	4,687		4,004	
				b	1,511		1,294	
				a+b	6,198	41,5	5,298	46,3
	2	„	3 Woch.	a	2,659		2,334	
				b	1,724		1,366	
				a+b	4,383	58,6	3,700	62,5
	3	„	3 Woch.	a	4,376		3,730	
				b	0,016		0,786	
				a+b	5,392	49,1	4,516	54,2
B.	Vor d. Vers.	Reiskleie	0		13,44	—	12,54	—
	1	„	2 Woch.		7,868	41,5	6,394	49,2
	2	„	2 Woch.		8,179	39,1	6,790	46,1

Hiernach hat Actinomucor repens schon nach 2wöchentlicher Wachstumsdauer über 46% und nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer sogar 54 bis 63% hoher Fettsäuren zum Schwund gebracht. Die Intensität der Fettzehrung entspricht ungefähr dem makroskopischen Befund der Pilzrasenentwicklung. Wenn das Wachstum der Pilzrasen stillsteht, so scheint keine Fettzehrung mehr stattzufinden, denn der prozentische Verlust des Fettes nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer (63%) ist verglichen mit demjenigen nach 1 Monat (62%) fast gleich geblieben.

III. Einige mißlungene Versuche der Züchtung von Actinomucor repens in einfachen fetthaltigen Nährböden.

Nachdem ich mich von der ganz energisch fettzehrenden Wirkung von Actinomucor repens überzeugt hatte, wollte ich versuchen, mittels dieses Pilzes Abbauprozesse des Fettes kennen zu lernen. Nach meiner Erfahrung wächst dieser Pilz in verschiedenen festen Nährböden sehr üppig, so namentlich auf Reiskleie, gekochtem Reis, Organpulver sowie in Gelatinenährböden. Solche Nährböden sind indessen, wie ersichtlich, für unsere Zwecke nicht geeignet, weil in ihnen neben Fett viel Eiweiß und Kohlenhydrate enthalten sind. Die Schwierigkeit liegt darin, daß die

Aufgabe sich nur dann ganz einwandfrei lösen läßt, wenn der Pilz in einem solchen Nährboden üppig wächst, in dem außer Fett weder Eiweiß noch Kohlenhydrat enthalten ist. Hierüber habe ich einige Versuche angestellt, indem ich als Fett denjenigen Teil der geschmolzenen Schweineschmalze, der im Eisschrank flüssig blieb, und gegen Rosolsäure ganz schwach sauer reagierte, und als Nährsalzlösung folgende Mischung benutzte:

5 g KH_2PO_4, 2,5 g $MgSO_4$, 15 Tropfen $FeCl_3$ (5%ig), Aq. destillata ad 1 l.

Zu dieser Nährsalzlösung wurden als Stickstoffquelle dann 10 g Harnstoff zugesetzt.

Öl und Nährsalzlösung allein in verschiedener Mischung mit Pilzsporenaufschwemmung geimpft, weisen keine Entwicklung der Schimmelpilze selbst nach Wochen auf. In konzentrierter Peptonlösung (Witte) entwickeln sich die Pilze sehr unvollkommen. Ebenso dürftig war das Wachstum in fetthaltiger Peptonlösung. Wird hierzu Nährsalzlösung zugesetzt, so wächst der Pilz ziemlich gut. In mit Wasser oder Nährsalzlösung befeuchtetem Stärkemehl wächst der Pilz sehr mangelhaft. Wird hierzu Fett gesetzt, so findet ein reichliches Wachstum der Pilze statt. Die Schimmelpilze wachsen im allgemeinen nur an der Oberfläche der Flüssigkeit, nicht aber in ihrem inneren Teil. Sie gedeihen in festen Nährböden viel besser als in flüssigen. Daher habe ich verschiedene mit Nährsalzlösung befeuchtete Gemische von Öl und indifferenten Pulvern, wie z. B. Seesand, Quarzsand, Talkpulver u. dgl. versucht. Aber sie wachsen nur langsam und spärlich. Somit konnte ich den gewünschten Zweck nicht erreichen.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

1. Die Beobachtung von M. Kumagawa, daß lufttrockenes Organpulver (Rindfleisch) beim Verschimmeln in beträchtlichem Grade seinen Fettgehalt einbüßt, konnte ich durch die Reinkultur verschiedener Schimmelpilze in lufttrockenen Pferdeleberpulvern vollkommen bestätigen.

2. Alle von mir untersuchten 5 Schimmelpilze, nämlich Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum, Aspergillus glaucus, Aspergillus nidulans und Actinomucor repens haben fettzehrende Wirkungen. Dieselben sind indessen je nach den Pilzarten sehr verschieden. Unter den aufgezählten Pilzen hat Actinomucor repens eine am stärksten fettzehrende Wirkung. Derselbe hat nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer über 60% des Leberfettes zum Schwund gebracht. Dann verzehrten Aspergillusarten 17 bis 20%, Cladosporium herbarum 14% und Penicillium glaucum nur 6 bis 8% des Leberfettes.

3. Die Versuche, Actinomucor repens in einfachen fetthaltigen Nährböden zu züchten, um den Abbauprozeß des Fettes näher kennen zu lernen, sind mißlungen.

4. Bei der Fettbestimmungsmethode bleiben die Pilzrasen auch nach der Verseifung ungelöst und bilden bei der Neutralisation mit Salzsäure Niederschläge, die etwas Fettsäuren einschließen. Dieselben entgehen der Bestimmung, wenn sie nicht besonders extrahiert werden. Deshalb eignet sich hier die indirekte Verseifung nach der Alkoholextraktion besser als die direkte Verseifung.

5. Bei der vorgeschrittenen natürlichen Fäulnis des Leberbreis, wo verschiedene Fäulnisbakterien und Schimmelpilze durcheinander wachsen, vermehren sich die Petrolätherextrakte beträchtlich. Dieselben sind indessen tief braunschwarz gefärbt und enthalten neben hohen Fettsäuren verschiedene Beimengungen. Die bloße Vermehrung der Petrolätherextrakte bei der vorgerückten natürlichen Fäulnis gibt uns keinen Beweis für die Fettneubildung. Um das Verhalten des Leberfettes gegen Fäulnisbakterien festzustellen, gewinnt man wohl nur dann einen richtigen Aufschluß, wenn man mit Reinkulturen der Saprophyten arbeitet.

Zum Studium der Atmungsenzyme der Pflanzen.

Von

W. Zaleski.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Samen einiger Pflanzen, besonders die der Erbsen, stellen ein geeignetes Objekt zum Studium der Atmungsfermente dar.[1]) So scheiden die gepulverten und dann durch Äther oder Aceton abgetöteten Erbsensamen nach dem Befeuchten derselben mit Wasser eine bedeutende Menge Kohlensäure aus. Je nach der Menge und Wirkungsdauer von Aceton auf diese Samen bekommt man Präparate von verschiedener Qualität. Um die abgetöteten Objekte mit wirksamen Atmungsfermenten zu erhalten, ist es notwendig, den Charakter der Wirkung verschiedener organischer Lösungsmittel, die gewöhnlich zu diesem Zweck dienen, auf die Pflanzen und Atmungsfermente derselben näher zu untersuchen.

Buchner und seine Mitarbeiter[2]) haben sich zur Darstellung von Dauerhefe einiger organischer Lösungsmittel bedient. Es ergab sich, daß Aceton das geeignetste Mittel zur Gewinnung von Dauerhefe darstellt, während Äthylalkohol Zymase schädigt und Methylalkohol diese vernichtet.

Die höheren Pflanzen sind weniger als die Hefe zur Darstellung von Dauerpräparaten geeignet. Um die Pflanzen mit organischen Lösungsmitteln rasch zu töten und Präparate mit wirksamen Atmungsfermenten aus denselben zu gewinnen, müssen wir zuvor ihre Struktur zerstören. Die Zerstörung der Struktur wirkt aber verschieden auf die CO_2-Ausscheidung der Pflanzen.

Zuerst hat Godlewski[3]) die Meinung ausgesprochen, daß die Zerstörung der cellularen Struktur die Atmungsenergie der Samen ver-

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, diese Zeitschr. 27, 1910.

[2]) E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903.

[3]) Godlewski und Polzenius, Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1901.

mindert. Der Verfasser schreibt, daß „die Zerstörung der Zellenstruktur der Samen durch Zerreiben derselben eine nahezu vollständige Sistierung der Kohlensäurebildung zur Folge hatte", und weiter: „Die intramolekulare Atmung der Erbsensamen ist an die Zellenstruktur derselben gebunden." In den Versuchen des Verfassers befanden sich die zerriebenen Samen unter dem Wasser, wodurch die Atmungsenergie derselben sehr gering war. Wenn wir aber die gepulverten Erbsensamen mit Wasser befeuchten, so atmen sie in der Luft und im Wasserstoff sehr energisch und sogar stärker als intakte Objekte.[1]) Wir haben gezeigt, daß verschiedene Samen nach dem Zerreiben derselben bedeutend mehr Kohlensäure als die unversehrten ausscheiden.[2]) Dasselbe zeigen auch unsere Versuche mit einigen Knollen. Dagegen atmen andere Objekte, besonders die Keimpflanzen und Blätter nach der Zerstörung ihrer Struktur schwächer, und manchmal scheiden sie sehr geringe Mengen Kohlensäure aus. Überhaupt kann man sagen, daß die Zerstörung der Struktur am stärksten die Atmung derjenigen Objekte vermindert, die im Zustande tätigen Lebens sich befinden oder wasserreich sind. Noch stärker wird die Kohlensäureausscheidung zerriebener Objekte nach dem Behandeln derselben mit organischen Lösungsmitteln, wie Aceton und Alkohol vermindert, und manchmal hört diese ganz auf. Zwar können wir die Pflanzen durch Trocknen entwässern, aber dieses Verfahren ist nicht immer brauchbar. So schädigt das Trocknen einiger Knollen und besonders der gequollenen Samen die Atmungsenergie derselben nicht, da diese nach dem Pulverisieren und Befeuchten mit Wasser sehr energisch CO_2 ausscheiden. Dagegen wirkt das Trocknen schädlich auf die Kohlensäurebildung der turgescenten, wasserreichen Organe, die im Zustande tätigen Lebens sich befinden. So scheiden, wenn wir die getrockneten Pflanzen durch Einweichen derselben im Wasser auf den früheren Wassergehalt bringen oder nach dem Pulverisieren mit Wasser befeuchten, dann in vielen Fällen eine geringe Menge Kohlensäure aus. Dieses Resultat hängt nicht von der Strukturzerstörung der Pflanzen ab, und ich habe manchmal beobachtet, daß die getrockneten, pulverisierten und erfrorenen Pflanzen gleich stark atmen. Mann kann vermuten, daß das Abtöten der turgescenten Pflanzen durch Trocknen oder Erfrieren die Kohlensäureausscheidung derselben vermindert, aber dann wäre es unverständlich, warum das Abtöten der Samen vermittels Erfrieren oder Aceton zu anderen Resultaten führt. Ich denke, daß hier auch andere Momente eine wichtige Rolle spielen.

Es ist sehr möglich, daß die Pflanzen während ihres tätigen Lebens einen geringen oder keinen Vorrat an Atmungsfermenten haben, da die Bildung und der Verbrauch derselben Hand in Hand gehen. Zugunsten dieser Vermutung sprechen meine Versuche mit einigen Pflanzen, die zeigen, daß während des Hungers derselben eine Vermehrung der Atmungs-

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.
[2]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.

fermente stattfindet.[1]) Außerdem spielen dabei der Vorrat an entsprechendem Atmungsmaterial sowie das Medium eine wichtige Rolle.

Alles spricht dafür, daß die turgescenten, wasserreichen Pflanzen zur Herstellung von Dauerpräparaten wenig geeignet sind.

Dagegen sind die Samen zur Darstellung von Dauerpräparaten brauchbar. Die Samen sind wasserarm und atmen nach der Zerstörung ihrer cellularen Struktur sehr energisch. Außerdem enthalten die Samen einen gewissen Vorrat an den Atmungsfermenten. Wie unsere Versuche zeigen, können wir aus den in bestimmten Mineralsalzlösungen eingeweichten Samen nach dem Trocknen und Pulverisieren derselben sehr energisch atmende Präparate gewinnen.[1]) In diesem Falle aktivieren wir die Profermente oder vermehren vielleicht die Menge der Atmungsenzyme.

Zu unserem Zweck sind besonders diejenigen Samen geeignet, in denen anaerobe Prozesse stark hervortreten, z. B. die Erbsensamen. Das hängt wahrscheinlich davon ab, daß die Zerstörung der Struktur die Sauerstoffabsorption stark vermindert. Ich habe in Gemeinschaft mit A. Reinhard gezeigt,[2]) daß die Zerstörung der cellularen Struktur verschiedener pflanzlichen Objekte die Sauerstoffabsorption vermindert und sogar in denjenigen Fällen, in denen die Kohlensäureausscheidung gesteigert wird. Es gehen dabei oft die Oxydationsprozesse ohne Kohlensäurebildung vor sich. Wenn sogar gleich nach der Strukturzerstörung die energische Sauerstoffabsorption stattfindet, so fällt diese dann schnell ab.

Nach der Methode von Buchner und seinen Mitarbeitern[3]) wird die Hefe rasch vermittels Aceton oder Alkohol abgetötet, da sie Wasser enthält. Das ruhende, wasserarme Protoplasma kann resistenter sein. Kurzwelly[4]) und Schubert[5]) haben gezeigt, daß exsiccatortrockene Samen nicht nur bei Zimmertemperatur, sondern auch bei höheren Temperaturen außerordentlich resistent gegen Alkohol, Äther usw. sind, da sie in solchem Medium sehr lange Zeit ihre Lebensfähigkeit nicht einbüßen. Dieses Resultat erklärt sich aber nicht durch die Resistenz des Protoplasts, sondern durch die Undurchlässigkeit der Samenschalen für die oben genannten Stoffe.

---

[1]) Über diese Versuche werde ich später berichten.

[2]) Noch nicht veröffentlichte Arbeit.

[3]) E. Buchner, H. Buchner und Hahn, l. c.

[4]) Kurzwelly, Jahrb. d. wiss. Bot. 38, 1903.

[5]) Schubert, Flora 100, 1910.

Bevor wir zu unseren Versuchen übergehen, wollen wir auf Grund der vorhandenen Literatur die Wirkung organischer Lösungsmittel auf die Zellen und Atmungsfermente derselben berühren.

Die organischen Lösungsmittel, wie z. B. Äther, Alkohol, Aceton und Chloroform, wirken, indem sie in die Zellen eindringen und diese töten, direkt auf die Atmungsfermente oder üben auf diese einen indirekten Einfluß aus. Über die direkte Wirkung dieser Substanzen auf die Atmungsfermente wissen wir sehr wenig und hauptsächlich über die Zymase der Hefe.[1]) Der indirekte Einfluß dieser Stoffe kann aber sehr verschieden sein.

Die organischen Lösungsmittel zerstören die normale Struktur der Zellen, da sie die Lipoide lösen und Eiweißstoffe gerinnen machen, wodurch die Eigenschaften der plasmatischen Membranen verändert werden, die aus Eiweißstoffen oder Lipoiden bestehen oder eine Art Mosaik darstellen, deren Steinchen teils aus Lipoiden, teils aus plasmatischem Material zusammengesetzt sind. Durch die Veränderung der Struktur der Membranen des Plasmas und der Vacuolen wird die Lokalisation der chemischen Reaktionen in den Zellen gestört, wenn eine solche wirklich durch diese Momente bedingt ist, wie es einige Forscher annehmen. So sagt z. B. Buchner[2]): „Die Zelle besteht aus verschiedenen getrennten Werkstätten, deren Agenzien und Produkte, solange das Leben der Zelle dauert, voneinander getrennt bleiben. denn sonst würden sie sich gegenseitig angreifen. Es genügt die Annahme, daß die einzelnen Werkstätten getrennt sind, z. B. durch mit Cholesterin imprägnierte Grenzschichten des Protoplasts." Die Zerstörung der Struktur der Zellen unter der Wirkung der oben genannten Stoffe beschränkt sich nicht nur auf die Membranen derselben. Der Hauptanteil des Protoplasts besteht aus den Eiweißstoffen und Lipoiden, die verschiedene Stoffe adsorbieren und lockere oder fester gefügte Verbindungen mit diesen und wahrscheinlich miteinander geben. Mit Recht sagt Palladin[3]), daß „die Lipoide als ein Zement funktionieren, der im lebenden Protoplasma die verschiedensten Stoffe zu einem ganzen verbindet". Weiter sind die Lipoide Lösungsmittel für viele Stoffe und dienen zur Herstellung der kolloidalen Lösungen. Indem wir die Lipoide aus den Zellen herauslösen oder die Eiweißstoffe gerinnen machen, stören wir dadurch die Lokalisation der chemischen Reaktionen und verändern die physikalischen Eigenschaften des Mediums, in dem Fermente wirken.

Weiter vermuten verschiedene Forscher, daß die Lipoide direkt auf die Fermente wirken. So sagt z. B. Abderhalden[4]): „Es ist wohl möglich, daß das Lecithin und die übrigen zur Gruppe der Phosphatide gehörenden Verbindungen in den tierischen Zellen Aktivatoren sind,

[1]) Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, 1910. — Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkungen, 1910.

[2]) E. Buchner und M. Hahn, l. c.

[3]) Palladin und Stanewitsch, diese Zeitschr. 26, 1910.

[4]) Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chem., 1909.

und zwar vielleicht der intercellularen Fermente." Auch weisen andere Forscher darauf hin, daß die Lipoide verschiedene Fermente aktivieren und paralysieren können.[1])

Einige Forscher, z. B. Fränkel und Dimitz[2]), nehmen an, daß die Lipoide, nämlich die ungesättigten Pbosphatide, sich an den Oxydations- und Reduktionsprozessen der Zellen beteiligen.

In der unlängst erschienenen Arbeit weisen Palladin und Stanewitsch[3]) darauf hin, daß die Lipoide einen großen Einfluß auf die Atmung der Pflanzen haben. Die Verfasser haben Weizenkeime mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert und nach der Entfernung des Extraktors an der Luft getrocknet. Dann wurden die extrahierten Weizenkeime $^1/_2$ Stunde lang in Wasser eingeweicht und in den Atmungsapparat zur Bestimmung der von ihnen ausgeschiedenen Kohlensäure eingeführt. Die Verfasser sagen, daß „ein Extraktionsmittel um so schädlicher auf die Kohlensäureausscheidung der abgetöteten Pflanzen einwirkt, je mehr Lipoide und Phosphor es letzteren entzieht". Am wenigsten vermindert die Kohlensäureausscheidung der Weizenkeime die Extraktion derselben mit Toluol und Aceton, während Chloroform, Äther und besonders Äthylalkohol nachteiliger in diesem Falle einwirken.

Da aber die oben genannten Forscher die abgetöteten Weizenkeime in Wasser eingeweicht haben, so wurde dadurch die Exosmose aus den Zellen nicht vermieden, und daher bleibt es unbekannt, in welcher Weise die Lipoidextraktion in diesem Falle wirkt. Das Einführen von Toluol in den Atmungsapparat beseitigt den Parallelismus zwischen der Lipoidextraktion und Kohlensäureausscheidung. Ob dieses Resultat von Toluolzusatz oder von anderen Ursachen abhängt, das bleibt unbekannt. Weiter ist es sehr schwer, durch Trocknen an der Luft aus den extrahierten Keimen die verschiedenen Extraktionsmittel vollständig zu entfernen, die wahrscheinlich die Benetzbarkeit der Keime und daher auch Exosmose einiger Substanzen ins Wasser in verschiedenem Grade beeinflussen. Über die Rolle der Exosmose in diesem Falle spricht ein folgender Versuch, der von mir ausgeführt wurde.

Versuch 1.

Es wurden einige Portionen der exsiccatortrockenen Weizenkeime zu je 7 g mit Äther (wasserfrei), Aceton, Methyl- und Äthylalkohol (99,8%) extrahiert. Die Extraktion dauerte 4 Tage, und im Verlaufe dieser Zeit wurden die Keime mit je 70 ccm des betreffenden Lösungsmittels übergossen, das nach 2 Tagen abgegossen und durch dieselbe Menge des frischen Extraktionsmittels ersetzt wurde. Dann wurden die Keime, nach der Entfernung der Flüssigkeit, mit Papier abgetrocknet und zuerst an der Luft

[1]) Literatur bei Centanni, diese Zeitschr. 29, 1910.

[2]) Fränkel und Dimitz, Wiener klin. Wochenschr. 1909, 51.

[3]) Palladin und Stanewitsch, l. c.

bei Zimmertemperatur und nachher im Thermostaten bei 36 bis 37° getrocknet. In anderen Fällen wurden die mit Aceton und Alkohol extrahierten Keime noch mit je 40 ccm Äther 24 Stunden lang extrahiert, mit diesem ausgewaschen und dann in derselben Weise getrocknet. Außerdem wurden andere Portionen der Weizenkeime (7 g) 4 Tage lang mit Äthylalkohol befeuchtet (15 ccm) und dann sorgfältig mit Äther ausgewaschen und getrocknet. Dann wurden die in der oben beschriebenen Weise extrahierten Keime mit 8 bis 10 ccm destillierten Wassers durchfeuchtet und auf Papier in den Atmungsapparat hineingebracht. Die Keime saugen sehr schnell Wasser auf. Gleichzeitig wurde die Kohlensäureausscheidung der gepulverten Keime (7 g) bestimmt.

	CO_2 pro $1^1/_2$ Std. mg
Kontrollkeime gepulvert	7—8
Ätherkeime	14,5—17,2
Acetonkeime	16,5
„ mit Äther ausgewaschen	15,5
Äthylalkoholkeime	7,5
„ mit Äther ausgewaschen	8,5
„ mit Alkohol befeuchtet und mit Äther ausgewaschen	5
Methylalkoholkeime mit Äther ausgewaschen	0

Zuerst sehen wir, daß die mit Äthylalkohol (99,8%) extrahierten Keime eine ziemlich bedeutende Menge Kohlensäure ausscheiden, während in den Versuchen von Palladin und Stanewitsch keine Kohlensäurebildung in diesem Falle stattfindet. Weiter bemerken wir keinen Unterschied zwischen der Energie der Kohlensäureausscheidung der Aceton- und Ätherkeime. Die mit Äther und Aceton extrahierten Keime scheiden viel mehr CO_2 als die Alkoholkeime aus, während Methylalkoholextraktion die Kohlensäurebildung hemmt. Ich muß aber bemerken, daß die Extraktion nicht vollständig war, da nur die Ätherflüssigkeit ganz farblos war, während die letzten Aceton- und Alkoholextrakte noch schwach gelbe Farbe hatten, obwohl ich mich zur Extraktion von 7 g Weizenkeimen 140 ccm des Extraktionsmittels bediente, während die oben genannten Forscher für die von 100 g Weizenkeimen nur 800 ccm des Lösungsmittels

genommen hatten. Das hängt wahrscheinlich davon ab, daß die Qualität der Weizenkeime sehr verschieden war. In der Tat war die Atmungsenergie der von mir benutzten Keime sehr schwach, während diese in den Versuchen von Palladin und Stanewitsch sehr lebhaft atmeten. Palladin[1]) sagt, daß die Atmungsenergie der Weizenkeime verschiedener Sendungen[2]) erheblich schwankt. Tatsächlich bekommen wir, wenn wir auf Grund der Versuchszahlen verschiedener Forscher die Intensität der Atmung der Keime berechnen, sehr voneinander abweichende Zahlen. So z. B. scheiden 100 g Weizenkeime nach Palladin und Stanewitsch 390, nach N. Iwanoff[3]) 100 bis 127, nach Burlakow[4]) 198 bis 228, nach Kostytschew[5]) 41 bis 71 und nach unseren Bestimmungen 114 bis 170 mg CO_2 pro Stunde aus. Die verschiedene Intensität der Atmung der Keime hängt nicht nur von dem Trocknen und der Aufbewahrungsdauer derselben vor der Absendung, sondern auch von der Menge der versehrten Keime und Verunreinigungen ab.

Die mit Alkohol befeuchteten Keime atmen sehr schwach und wahrscheinlich dadurch, daß Äther schwer den von ihnen aufgenommenen Alkohol daraus entfernt.

Nehmen wir an, daß unsere Keime abgetötet waren, oder daß die Extraktion derselben mit den oben genannten Lösungsmitteln unvollkommen war, so können wir dennoch nicht den Parallelismus zwischen der Menge der extrahierten Lipoide, besonders deren Phosphor- und CO_2-Ausscheidung bemerken, da Aceton- und Ätherkeime gleich stark atmen, obwohl die Phosphatide mehr in Äther löslich sind. Die Verminderung der Kohlensäureausscheidung der extrahierten Keime wird nicht durch die Menge der herausgelösten Stoffe, sondern durch die Qualität derselben bedingt. In einigen Fällen beobachtete ich bei der allmählichen Extraktion der Keime eine gewisse Steigerung der Kohlensäureausscheidung, während in anderen Fällen ein gewisser Parallelismus zwischen CO_2-Bildung und der Menge des Extraktionsmittels und Wirkungsdauer derselben zu bemerken war.

[1]) Palladin, Jahrb. f. wiss. Botan. 1910.
[2]) Zürich, Maggi, Stadtmühle.
[3]) N. Iwanoff, Bull. de l'Acad. de Sc. Petersbourg, VI. Ser., 1910.
[4]) Burlakow, Arb. d. Charkower Ges. d. Naturf. 31, 1897.
[5]) Kostytschew, diese Zeitschr. 15, 1909.

Ich will noch einen Versuch anführen, den Herr Jakowleff auf meinen Vorschlag ausgeführt hat.

Versuch 2.

8 g Weizenkeime. Die Extraktion dauerte 5 Tage und wurde 4mal mit je 25 ccm des Extraktionsmittels ausgeführt. Die Versuchsanordnung wie im ersten Versuche. Weizenkeime anderer Sendung.

Extraktionsmittel	CO_2 pro 3. Std. mg
Aceton	58—58
Äther	53—54
Äthylalkohol (99,8%) . .	34—35
Chloroform	23—23
Kontrollkeime pulverisiert	30

Auch in diesem Versuche waren nur die Ätherextrakte farblos.

Die interessanten Versuche von Palladin zeigen, daß die Extraktionsmittel in verschiedenem Grade die innere Struktur der Keime zerstören und dadurch die Atmungsenzyme verschieden beeinflussen. In der Tat sehen wir, daß Alkoholkeime gleich stark wie die pulverisierten atmen. Dafür sprechen auch die Extraktionsversuche der pulverisierten Keime. So z. B.

Versuch 3.[1])

Extraktionsmittel	CO_2 pro Stunde mg
Äther 1mal extrahiert	9,5
„ 2 „ „	9,0
„ 3 „ „	10,0
Alkohol 99,8% 1mal extrahiert	5,5
„ 2 „ „	5,1
„ 3 „ „	5,5
Kontrollkeime pulverisiert . . .	10,0

Alkoholextraktion vermindert die CO_2-Ausscheidung der pulverisierten Keime, während Ätherextraktion die Energie derselben nicht verändert.

Ich will vorläufig keinen allgemeinen Schluß aus unseren Versuchen ziehen, da die Frage über die Wirkungsweise der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsenzyme der Pflanzen

[1]) Dieser Versuch wurde von Herrn Jakowleff ausgeführt.

sehr verwickelt ist. Ich habe die oben beschriebenen Versuche angeführt, da sie über die Untersuchungsmethode der Kohlensäureausscheidung der extrahierten Objekte sprechen.

Meine weiteren Versuche verfolgen einen anderen Zweck. Ich habe mir zur Aufgabe gestellt, die Wirkung verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Samen zu prüfen, um Präparate mit wirksamen Atmungsenzymen zu erhalten. Meine Versuche haben auch noch einen anderen Zweck.

Ich habe vor kurzem gezeigt,[1]) daß nur zweibasische Phosphate die fermentative Kohlensäureausscheidung der Erbsensamen steigern, während andere Mineralsalze diese vermindern, wenn die Konzentration derselben nicht zu gering ist. Da aber die Atmungsfermente in einem sehr komplizierten Medium wirken und da wir zurzeit keine Methoden zum Isolieren dieser Fermente besitzen, so bezweckte ich, das Medium durch die Extraktion der Objekte mit organischen Lösungsmitteln zu verändern, um die Wirkung der Mineralsalze auf die enzymatische Kohlensäureausscheidung wieder zu prüfen.

Da unsere früheren Versuche meistens mit Erbsensamen ausgeführt waren, so bediente ich mich auch jetzt dieses Objekts, das sehr wirksame Atmungsenzyme enthält.

Es ist interessant, daß pulverisierte Erbsensamen im Verlauf einiger Stunden in der Luft und im Wasserstoff gleiche Mengen der Kohlensäure ausscheiden. Da Phosphate die Kohlensäureausscheidung steigern, so beobachten wir in diesem Falle ungeachtet der ausgezeichneten Aeration typische Gärung. Ob dabei auch Alkohol sich bildet, bleibt unbekannt.

Meine in Gemeinschaft mit A. Reinhard[2]) ausgeführten Versuche zeigen, daß weder zweibasische Phosphate, noch andere Mineralsalze, wie KNO_3, $Ca(NO_3)_2$, KH_2PO_4 und $MgSO_4$, in 0,25 bis 1 %iger Lösung die Sauerstoffabsorption der gepulverten Erbsensamen stimulieren. In derselben Weise wirken diese Stoffe auch auf die Sauerstoffabsorption der vorher mit Äther abgetöteten Erbsensamen. Man kann also denken, daß der von Erbsenpulver absorbierte Sauerstoff zu denjenigen Oxydationsprozessen verbraucht wird, die ohne Kohlensäurebildung vor

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard.

[2]) Noch nicht veröffentlichte Arbeit.

sich gehen. So stimulieren zweibasische Phosphate die Peroxydase[1]) und Tyrosinase der Erbsen.[2])

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der von den gepulverten Erbsensamen absorbierte Sauerstoff nicht in den ersten Stunden des Versuches, sondern später zu wirken beginnt, und wenngleich Phosphate die Energie der Sauerstoffabsorption nicht verändern, wissen wir dennoch nicht, welcher Anteil des absorbierten Sauerstoffs zur CO_2-Bildung und welcher zu anderen Oxydationsprozessen verbraucht wird.

Wenn Iwanoff die stimulierende Wirkung der Phosphate auf die Oxydationsprozesse der gepulverten Erbsensamen verneint,[3]) so zeigen dennoch seine Versuche,[4]) daß diese Objekte viel schwächer in Wasserstoff als in der Luft atmen. Diese Erscheinung tritt aber in den lange dauernden Versuchen auf, und daher spricht für die oben geäußerte Vermutung, daß der Sauerstoff nur später zu wirken beginnt. Wir werden gerne Iwanoff beistimmen, wenn er seine Behauptungen durch neue Versuche, nicht aber auf Grund der Analogien mit Hefegärung beweisen wird. In jedem Falle zeigen die gepulverten Erbsensamen in den ersten Stunden des Versuches an der Luft den typischen anaeroben Atmungsprozeß.

Nach diesen Bemerkungen wollen wir zu unseren Versuchen übergehen.

In diesen Versuchen wurde eine bestimmte Menge (20 bis 30 g) der nicht zu fein gepulverten Erbsensamen in Gefäße mit gut geschliffenen Glasstopfen eingeführt und mit einer bestimmten Menge der Extraktionsflüssigkeit übergossen. In anderen Versuchen wurde die Substanz mit einer geringen Quantität der betreffenden Flüssigkeit versetzt, um die Masse nur zu befeuchten und auf diese Weise die Extraktion, wenn nicht aus den Zellen, sondern aus dem Präparat zu beseitigen. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Substanz auf das Filter gebracht und getrocknet oder aufs neue extrahiert. In diesem Falle wurde die Flüssigkeit abfiltriert und die Substanz von neuem mit Lösungsmittel übergossen. Diese Operation wurde 2 bis 4 mal ausgeführt, und jedesmal wurde die auf dem Filter zurückgebliebene Substanz in das Gefäß zurückgebracht.

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.
[2]) Wolff, zit. nach Chem. Centralbl. 1910, I, 19.
[3]) L. Iwanoff, dies Zeitschr. 29, 1910.
[4]) L. Iwanoff, ibid. 25, 1910.

Die befeuchtete oder extrahierte Substanz wurde mit Filtrierpapier getrocknet, an der Luft ausgebreitet und zuletzt im Thermostaten bei 36 bis 50° über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Im ganzen dauerte das Trocknen 2 bis 4 Tage.

Das getrocknete Versuchsmaterial wurde in kleinen Krystallisierschalen mit einer solchen Quantität destillierten Wassers versetzt, daß ein dichter, gleichmäßig befeuchteter Brei sich bildete, den man leicht auf Papier schmieren und in den Atmungsapparat hineinbringen konnte. Die Substanz ist schwer benetzbar, und man muß allmählich unter beständigem Umrühren der Substanz mit dem Spatel Wasser hinzufügen. Nach meinen Bestimmungen ist die stündliche Kohlensäureausscheidung im Verlaufe von 4 Stunden konstant. Ich habe meistens die Kohlensäureausscheidung pro 2 Stunden bestimmt und führe in der vorliegenden Mitteilung nur die stündliche Größe derselben an.

In unseren Versuchen können wir daher die Anwendung des Antiseptikums unterlassen um so mehr, als dieses, z. B. Toluol, die Kohlensäureausscheidung um 45% vermindert.

Iwanoff[1]) hat uns den Vorwurf gemacht, daß wir „leider unter nicht sterilen Bedingungen" die Kohlensäureausscheidung bestimmt hatten. Dem Verfasser ist augenscheinlich ein Mißverständnis unterlaufen, da das vielmehr auf seine als auf unsere Versuche sich bezieht. Unsere Versuche sind die kurzdauernden, während Iwanoff in einigen Fällen ohne Antiseptikumzusatz Weizenkeime 23 Stunden lang im geschlossenen Raume hielt (Tabelle II). Weiter bestimmte Iwanoff die Atmung lebender Erbsensamen, die in einer dünnen Flüssigkeitsschicht 92 Stunden lang sich befanden. In anderen Versuchen bediente sich der Verfasser des Toluols und leitete den Luftstrom sehr lange durch den Atmungsapparat, ohne dabei eine Flasche mit Toluol einzuschalten. Die Versuche von Iwanoff wurden wirklich „leider unter nicht sterilen Bedingungen" ausgeführt.

Über die Arbeit der Enzyme können wir nach der Reaktionsgeschwindigkeit urteilen, und in diesem Falle sind die kurz dauernden Versuche meiner Meinung nach brauchbar, da die Atmungsenzyme sehr empfindlich sind, und da in den lange dauernden Experimenten auch andere Momente hervortreten. So wird z. B. Zymase allmählich durch Endotryptase im Preßsafte der Hefe zerstört.

[1]) Iwanoff, diese Zeitschr. 29, 1910.

Versuch 4.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden 24 Stunden lang mit je 70 ccm 99,8 und 92% Äthylalkohol extrahiert und dann bei 36° getrocknet.

Alkohol %	CO_2 pro Stunde mg
99,8	6,7
92,0	3,0

Versuch 5 und 6.

Das mit 99,8% Äthylalkohol extrahierte Samenpulver wurde 1. mit destilliertem Wasser, 2. mit K_2HPO_4 1% und 3. mit KNO_3 1% befeuchtet. Es wurden Portionen zu je 30 g genommen.

		CO_2 pro Stunde mg
H_2O	6,3	5,5
K_2HPO_4 1%	10,8	12,1
KNO_3 1%	3,6	3,5

Versuch 7.

Vier Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden in 2 bis 5 Tagen 1 bis 4mal mit je 70 ccm (im ganzen 70 bis 280 ccm) Äthylalkohol 99,8% extrahiert. Zwei andere Portionen wurden 2 bis 5 Tage mit je 15 ccm Alkohol befeuchtet.

Alkohol-extraktionsdauer Tage	Alkoholmenge ccm	CO_2 pro Stunde mg	Alkohol-befeuchtungsdauer Tage	CO_2 pro Stunde mg
2	70	7,5	2	4,5
3	140	6,6	3	5,2
4	210	6,8	4	4,5
5	280	7,6	5	5,0

Versuch 8.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen wurden mit 15 ccm Äthylalkohol 99,8% befeuchtet, die zwei anderen aber wurden 2 Tage mit je 70 ccm desselben Lösungsmittels extrahiert. Alle Portionen wurden zuerst bei 36° und dann bei 80° oder über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Extrahiert und im Vakuum getrocknet	6,7
Befeuchtet „ „ „ „	2,5
Extrahiert und bei 80° getrocknet	6,7
Befeuchtet „ „ „ „	2,3

Versuch 9.

Vier Portionen des Pulvers der Erbsensamen zu je 30 g wurden teils mit je 70 ccm Äthylalkohol übergossen, teils mit je 15 ccm desselben befeuchtet. Nach 2 Tagen wurden die befeuchteten Portionen auch mit je 70 ccm Alkohol übergossen. Nach 4 Tagen wurden alle Portionen von Alkohol befreit, zwei dieser Portionen wurden bei 36° getrocknet, die anderen aber wurden sorgfältig mit Äther ausgewaschen, um die Alkoholspuren zu entfernen, und dann in derselben Weise getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Extrahiert	6,2
„ und mit Äther ausgewaschen	6,5
Vorher befeuchtet	3,2
„ „ und mit Äther ausgewaschen	3,4

Versuch 10.

Drei Portionen der gepulverten Samen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 2 bis 5 Tagen 1 bis 4mal mit je 100 ccm Aceton extrahiert. Drei andere Portionen wurden mit je 15 ccm Aceton befeuchtet.

Acetonwirkungsdauer Tage	Acetonmenge ccm	CO_2 pro Stunde mg	Befeuchtungsdauer Tage	CO_2 pro Stunde mg
2	200	11,0	2	8,0
4	300	8,5	4	8,0
5	400	9,0	5	7,0

Versuch 11.

Vier Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 4 Tagen mit je 15 ccm Aceton befeuchtet. Zwei dieser Portionen wurden dann bei 36 und bei 50° getrocknet, die anderen aber wurden sorgfältig mit Äther ausgewaschen und dann bei denselben Bedingungen getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Acetonpulver bei 36° getrocknet	8,0
„ „ 50° „	8,0
„ mit Äther ausgewaschen und bei 36° getrocknet	7,5
Acetonpulver mit Äther ausgewaschen und bei 50° getrocknet	8,5

Versuch 12.

Vier Portionen des Pulvers zu je 30 g wurden mit je 70 ccm Äther (wasserfrei) im Verlaufe von 2 bis 7 Tagen 1 bis 4mal extrahiert. Parallel wurden andere Portionen des Pulvers mit je 15 ccm Äther befeuchtet. Alle Portionen wurden bei 36° getrocknet.

Äther-wirkungsdauer Tage	Menge der Extraktionsflüssigkeit ccm	CO_2 pro Stunde mg	Befeuchtungs-dauer Tage	CO_2 pro Std. mg
2	70	15	2	16
7	70	11,2	—	—
5	210	10,8	5	16
7	280	11,0	7	16

Versuch 13.

Zwei Portionen des Pulvers der Erbsensamen[1]) zu je 20 g wurden 20 Stunden lang mit Äther befeuchtet (8 ccm), und zwei andere wurden 2 Tage mit je 30 ccm Äther extrahiert. Parallel wurde die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers bestimmt.

	CO_2 pro Stunde mg
Lebendes Pulver . .	12
Befeuchtet mit Äther	12
Extrahiert „ „	11

Versuch 14.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden 16 Stunden lang mit je 30 ccm Äther und Aceton extrahiert. Eine Acetonportion wurde außerdem mit Äther

[1]) Die Samen sind anderer Herkunft.

ausgewaschen. Parallel wurde die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers bestimmt.

	CO_2 pro Stunde mg
Lebendes Pulver	16,3
Äther-Pulver . . .	16—16,3
Aceton-Pulver	16,0
„ „ mit Äther ausgewaschen . . .	16,0

Versuch 15.

Sieben Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 4 Tagen 2mal mit 200 ccm (im ganzen also 400 ccm) der unten bezeichneten Lösungsmittel extrahiert. Eine dieser Portionen wurde mit je 70 ccm Aceton-Äthylalkohol und dann mit Äther extrahiert. Alle extrahierten Portionen wurden zuerst bei 37° und dann bei 50 oder 62° (2 Stunden lang) getrocknet.

Extraktionsflüssigkeit	CO_2 pro Stunde getrocknet bei 50° mg	bei 62° mg
Äther	8,0	9,0
Aceton	7,7	8,7
Chloroform	6,0	5,7
Äthylalkohol 99,8%	6,5	6,5
Aceton, Äthylalkohol, Äther . .	6,5	6,5
Methylalkohol[1])	keine Kohlensäureauscheidung	
Methylalkohol-Äther[1])	do.	

Wir sehen, daß Methylalkoholextraktion der gepulverten Erbsensamen die Zymase derselben schnell zerstört oder inaktiviert (Versuch 15). Durch Äthylalkoholextraktion wird die Wirksamkeit der Erbsenzymase schon nach 24 Stunden um die Hälfte geschwächt, wobei die Menge des Extraktionsmittels sowie die Wirkungsdauer desselben keine merkliche Rolle spielen, wie Versuch 7 zeigt. Das durch Alkoholextraktion geschädigte Enzym gewinnt seine frühere Energie durch zweibasische Phosphate zurück (Versuch 5 bis 6). Kaliumnitrat

[1]) Die Extraktion dauerte nur 24 Stunden.

in 1%iger Lösung wirkt schädlich, was unsere früheren Versuche bestätigen. Wenn diese Präparate eine geringe Alkoholmenge enthalten, so übt diese keinen Einfluß auf die Energie der Kohlensäurebildung aus, da wir nach dem Auswaschen des Präparates mit Äther, sowie nach dem Trocknen desselben bei 80° oder im Vakuum dieselbe Zahlen bekommen (Versuch 8 und 9). Die schädliche Alkoholwirkung tritt in denjenigen Versuchen hervor, in denen das Pulver mit einer geringen Quantität dieses Extraktionsmittels befeuchtet wurde, da die aus den Zellen, nicht aber aus dem Präparat herausgelösten Lipoide dieses zurückhalten. Das Trocknen solcher Präparate bei höheren Temperaturen vermindert die Kohlensäureausscheidung noch mehr (Versuch 8). Das sorgfältige Auswaschen des Präparates mit Äther beseitigt auch diese schädliche Wirkung nicht, und daher ist es wahrscheinlich, daß einige von den extrahierten Stoffen sich an der Luft zersetzen und daß die Zersetzungsprodukte derselben, nach dem Befeuchten des Pulvers mit Wasser, nachteilig auf die enzymatische Atmung einwirken. So z. B. vermindert Wasser-Lecithinemulsion (Handelspräparat) die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers.

Weniger nachteilig wirkt auf die fermentative Kohlensäureausscheidung der gepulverten Erbsensamen die Extraktion derselben mit Aceton und Äther. Die Steigerung der Acetonmenge bei der Extraktion oder vielmehr das Verlängern der Extraktionszeit bewirkt das allmähliche Absinken der von Erbsenpulver ausgeschiedenen CO_2-Mengen, aber nur bis zu einem gewissen Grade (Versuch 10). Noch deutlicher tritt ein gewisser Parallelismus zwischen Ätherextraktionsdauer des Pulvers und der von diesem ausgeschiedenen CO_2-Menge hervor (Versuch 12). Nach der kurz dauernden Extraktion des Erbsenpulvers mit Aceton und Äther sowie nach dem Befeuchten derselben mit Äther (Versuch 12, 13 und 14) scheidet es gleichviel Kohlensäure wie das lebende aus.

Aus unseren Versuchen ist zu ersehen, daß Äther und Aceton die geeignetsten Mittel zum Abtöten der Samen behufs Gewinnung der Präparate mit wirksamen Atmungsfermenten darstellen. Da wir aber Aceton nicht so leicht wie Äther aus dem Präparat entfernen können, so müssen wir in diesem Falle das Behandeln der Samen mit Äther vorziehen.

Die Wirkung der organischen Lösungsmittel hängt von de Vorbehandlung der Objekte ab. Wir haben schon oben gesehen, daß die abgetöteten Objekte (z. B. Weizenkeime) schwach auf Atherextraktion reagieren. Der folgende Versuch zeigt die Erscheinung deutlich.

Versuch 16.

Die bei 36° getrockneten und dann fein pulverisierten Spitzen der etiolierten Stengel von Vicia Faba Windsor wurden in zwei Portionen zu je 3,5 g geteilt. Die eine Portion wurde 2 Tage lang mit je 20 ccm Äther (wasserfrei) extrahiert und dann mit Äther gründlich ausgewaschen. Die mit Äther extrahierte Portion wurde zuerst an der Luft und dann im Thermostaten bei 36° getrocknet. Beide Portionen wurden mit Wasser befeuchtet, auf Papier gestrichen und in den Atmungsapparat hineingebracht.

Versuchsdauer	CO_2	
	Kontrollportion	Ätherportion
Stunden	mg	mg
1	8,5	8,7
3	13,0	14,5
4	21,5	23,2

Die Spitzen waren durch Trocknen abgetötet und wir sehen, daß 2tägige Atherextraktion keinen Einfluß auf die Energie der CO_2-Ausscheidung ausübt. Es ist verständlich, daß der Unterschied zwischen unseren Versuchen und den von Palladin und Stanewitsch nicht nur von den Untersuchungsmethoden, sondern von der Qualität der Keime abhängt. Auch die mechanische Zertrümmerung der Samen stört durch Steigerung einiger Funktionen und durch Ausfall einiger Vorgänge die Lebensharmonie derselben. Ferner tritt die Tätigkeit der Fermente in den Vordergrund, und wir sehen, daß das sog. lebende Pulver gleich stark wie das vermittels Äther abgetötete atmet.

Ich möchte an dieser Stelle nur zwei Versuche anführen, die über die Wirkung der organischen Lösungsmittel auf die Katalase und das Reduktionsvermögen der Gewebe sprechen.

Versuch 17.[1])

Einige Portionen der bei 36° getrockneten Preßhefe zu je 6 g wurden 4 Tage lang mit je 60 ccm Aceton, Äther,

[1]) Dieser Versuch wurde von Fräulein A. Rosenberg ausgeführt.

Methyl- und Äthylalkohol extrahiert. Die extrahierte Hefe wurde an der Luft, hierauf im Thermostaten bei 36° und schließlich in diesem bei 50° getrocknet. Die Alkoholportion wurde vorher mit Äther ausgewaschen. Dann wurden von je einer Portion der extrahierten Hefe 0,5 g abgewogen und mit 50 ccm destillierten Wassers versetzt und abfiltriert. 20 ccm des Filtrates wurden mit einer bestimmten Menge der 3%igen Hydroperoxydlösung versetzt.

Extraktionsmittel	Manometerstand des Quecksilbers nach 20 Minuten mm
Äther	64
Aceton	56
Äthylalkohol 99,8%	50
Methylalkohol	0
Kontrollportion	72

Versuch 18.[1])

Fünf Portionen der bei 36° getrockneten Preßhefe zu je 4 g wurden 2 Tage lang mit je 40 ccm Äther, Aceton, Chloroform, Äthyl- und Methylalkohol extrahiert; dann wurde die extrahierte Hefe zuerst an der Luft und schließlich im Thermostaten bei 36° getrocknet. Dann wurde von je einer Portion der extrahierten Hefe 1,5 g in Probiergläser eingeführt und mit 10 ccm destillierten Wassers und hierauf mit 0,2 ccm 0,05%iger Methylenblaulösung versetzt. Die Flüssigkeit wurde oben mit einer Schicht von Paraffinum liquidum übergossen, um das Methylenblau vom Luftsauerstoff zu isolieren, und darin die Geschwindigkeit der Entfärbung von Methylenblau bestimmt.

Extraktionsmittel	Entfärbungsdauer Minuten
Äther	25
Aceton	32
Chloroform	25
Äthylalkohol	15
Methylalkohol	keine Entfärbung nach 1½ Std.
Kontrollportion	25

[1]) Dieser Versuch wurde von Herrn B. Lubimoff ausgeführt.

Durch Methylalkoholextration wird die Hefekatalase vernichtet oder ihre Tätigkeit nur paralysiert, während andere Extraktionsmittel schwach wirken. Die Methylalkoholextraktion hemmt auch das Reduktionsvermögen der Hefe, während andere Extraktionsmittel keinen merklichen Einfluß auf dieses ausüben. Wenn Äthylalkoholextraktion der Hefe die Reduktion von Methylenblau beschleunigt, so hängt das von einer direkten Alkoholwirkung ab. Unsere Versuche zeigen, daß geringe Alkoholmengen die Reduktion des Methylenblau durch Hefe stark beschleunigen. Hingegen verlangsamt Acetonanwesenheit diesen Prozeß.

Weiter hat Korsakow[1]) gezeigt, daß die Extraktion der Weizenkeime mit organischen Lösungsmitteln die Größe der Proteolyse derselben in verschiedenem Grade vermindert. Einige in unserem Laboratorium ausgeführten Versuche zeigen, daß in derselben Weise auch die Verdauungskraft der Handelspräparate von Pepsin durch die vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln beeinflußt wird.

Was die Wirkungsweise der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsfermente betrifft, so sehen wir, daß diese sehr verschieden sein kann.

Wenn eine direkt schädliche und sogar spezifische Wirkung der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsenzyme nicht ausgeschlossen ist, so besteht doch ein gewisser Zusammenhang zwischen der Enzymwirksamkeit und den extrahierten Stoffen.

Wir haben schon oben gesehen, daß die Extraktion des Erbsenpulvers mit verdünntem Alkohol mehr als diese mit dem absoluten die Energie der Kohlensäureausscheidung desselben vermindert (Versuch 4). Die schädliche Wirkung des Extraktionsmittels steht in einem gewissen Parallelismus mit der Wasserlöslichkeit desselben. Es scheint also, daß die Substanzen der wässerigen Phase mehr als die Lipoide die Wirksamkeit der Atmungsenzyme beeinflussen. Die Natur dieser Substanzen sowie der Charakter des Einflusses derselben auf die Atmungsenzyme bleiben unbekannt. Wenn das Erbsenpulver nach Alkoholextraktion weniger Kohlensäure ausscheidet, so gewinnt dieses

[1]) Korsakow, diese Zeitschr. 28, 1910.

seine frühere Energie durch zweibasische Phosphate zurück, und man könnte daher eine solche stimulierende Wirkung auch den extrahierten Stoffen zuschreiben. Wenn aber durch Methylalkoholextraktion des Erbsenpulvers die Kohlensäureausscheidung sistiert wird, so spricht diese Tatsache dafür, daß Methylalkohol das Enzym zerstört oder die für die Wirksamkeit desselben unentbehrlichen Stoffe, z. B. Kofermente, extrahiert.

Die Atmungsfermente als Endoenzyme sind an den Protoplast der Zellen gebunden und werden nach der Zerstörung dieser Bindung freigegeben, und da sie sehr empfindlich sind, so werden sie je nach dem Charakter des Mediums in verschiedenem Grade abgeschwächt. Besonders sind die Atmungsenzyme in der Lösung empfindlich, wie wir oben in den Versuchen mit Weizenkeimen gesehen haben.

Untersuchungen über den Blutzucker.

IX. Mitteilung.

Weitere Beiträge zur Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker.

Von

P. Rona und A. Döblin.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Untersuchungen von Michaelis und von einem von uns (R.) haben sicher ergeben, daß die roten Blutkörperchen Zucker enthalten,[1]) und ferner, daß zwischen dem Zucker der Blutkörperchen und dem des Serums ein Austausch stattfinden muß, der aber nicht oder nur selten zu einem vollkommenen Ausgleich des Zuckergehaltes in und außerhalb der Blutkörperchen führt. Ein Ausdruck dieser Tatsachen ist der hohe Zuckergehalt im Gesamtblut bei Hunden mit alimentärer Glykämie (z. B. einmal 0,418, in einem anderen Falle 0,473% bei einem Zuckergehalt im Plasma von bzw. 0,457 und 0,518%), ferner der hohe Blutzuckerwert bei Diabetes mellitus, wie er von Hollinger und Michaelis und Rona in vielen Fällen konstatiert werden konnte. Mit diesem Befund war es jedoch schwer vereinbar, daß von einer Reihe von Forschern im Experiment außerhalb des Organismus die Blutkörperchen für Traubenzucker impermeabel gefunden worden sind. Die Untersuchungen von Hamburger, Gryns, Hedin u. a. führen den

---

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 16, 60, 1909; 18, 375, 1909. Vgl. auch Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

Beweis hierfür nur indirekt, indem sie die Undurchlässigkeit der Blutkörperchen aus gewissem Verhalten derselben in zuckerhaltigen Lösungen folgern. Frühere an gewaschenen Blutkörperchen angestellte Versuche von Michaelis und Rona[1]) sprachen auch für die Impermeabilität, während in Versuchen am Gesamtblut die Möglichkeit eines teilweisen Eindringens des Zuckers in die Blutkörperchen zugegeben werden mußte. Die damaligen Versuche in dieser Richtung waren jedoch nicht vollkommen entscheidend, weil für die Menge der Blutkörperchen nur willkürlich angenommen wurde, daß sie 33 Vol.-% des Gesamtblutes betrüge.

Die Versuche wurden nun wieder aufgenommen und in der Weise verfahren, daß zunächst die Zuckerverteilung im frischen, mit FNa versetzten menschlichen Blute festgestellt und gleichzeitig zu einem anderen Teil desselben Blutes eine konzentrierte (ca. 15%ige) Traubenzuckerlösung hinzugefügt wurde, bis zu einem Gehalt des Blutes an Traubenzucker von 0,3 bis 0,5%. Nach gründlichem Vermischen — etwa 1 bis 2 Minuten nach dem Zuckerzusatz — wurde dann die Zuckerverteilung wieder festgestellt. Den Gehalt an Blutkörperchen in Vol.-% bestimmten wir mittels eines Hedinschen Hämatokriten vor und nach dem Zuckerzusatz und berechneten aus den experimentell erhaltenen Daten den Zuckergehalt der Blutkörperchen. Diese berechneten Werte sind in der 3. Kolumne der Tabelle angegeben. Die Zuckerbestimmung erfolgte polarimetrisch nach vorheriger Enteiweißung mittels kolloidalen Eisenhydroxyds nach der Methode von Michaelis und Rona.

Die Versuchsergebnisse sind in der nebenstehenden Tabelle niedergelegt.

Die Volumprozente an Blutkörperchen betragen in den Fällen 1 bis 3 vor dem Zuckerzusatz 38, nach dem Zuckerzusatz bzw. 32, 32 und 35. In den Fällen 4 und 5 (eine stark anämische Patientin) fanden sich 25% an roten Blutkörperchen.

Aus den Versuchen geht nun eindeutig hervor, daß der Zuckerzusatz zu dem Blute sofort eine Erhöhung der Zuckerwerte der Blutkörperchen veranlaßt hat, diese also unter

---

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 18, 514, 1909.

den angegebenen Bedingungen für Zucker durchgängig sind; ferner aber auch, daß ein vollkommener Ausgleich nicht statthat. In keinem der Versuche war der Zuckergehalt im Plasma und in den Blutkörperchen ganz gleich geworden. Daß dieser Ausgleich auch nach 24 Stunden nicht erfolgt, zeigen frühere Versuche in der erwähnten Arbeit von Michaelis und Rona. Hier wurde bei Zusatz von Zucker zu Hundeblut (mit FNa) nach 24stündigem Stehen gefunden: in einem Falle im Plasma 0,626% Zucker, im Gesamtblut 0,574%, in einem zweiten im Plasma 1,22% Zucker, im Gesamtblut 0,869%. — Auch diese Tatsache steht mit den im lebenden Organismus beobachteten Verhältnissen in gutem Einklang.

		Zuckergehalt		
		im Gesamt-Blut %	im Plasma %	in den roten Blutkörperchen %
Fall 1 Mensch	a) sofort	0,094	0,098	0,089
	b) nach Zuckerzusatz	0,375	0,401	0,322
Fall 2 Mensch	a) sofort	0,128	0,175	0,056
	b) nach Zuckerzusatz	0,308	0,356	0,208
Fall 3 Mensch	a) sofort	0,076	0,097	0,066
	b) nach Zuckerzusatz	0,339	0,392	0,243
Fall 4 Mensch	nach Zuckerzusatz	0,437	0,478	0,316
Fall 5 Mensch	nach Zuckerzusatz	0,386	0,436	0,240

Die an geschlagenem Blut angestellten Versuche führten im wesentlichen zu dem gleichen Ergebnis; auch hier konnte, einen Versuch ausgenommen (vgl. Fall 10), ein Eindringen von Zucker in die Blutkörperchen nachgewiesen werden. Es hat aber den Anschein, als ob die Permeabilität unter diesen Bedingungen beschränkter wäre; die von den Blutkörperchen aufgenommene Menge Zucker war in einer Anzahl dieser Versuche im Vergleich zu der in den oben erwähnten Fällen aufgenommenen bedeutend geringer. Dies deutet möglicherweise auf eine Rolle des Fibrinogens bei dem Zuckeraustausch zwischen den Blutkörperchen und seinem Medium, doch konnten

verschiedene, zur Klärung der hier obwaltenden Verhältnisse angestellte Versuche bis jetzt keine Entscheidung bringen. Wir müssen uns daher zunächst mit der Konstatierung der Tatsache begnügen, daß eine Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker auch im geschlagenen Blut nachzuweisen ist. In den Fällen, in denen die Blutkörperchen erst nach Zuckerzusatz zuckerhaltig gefunden wurden, wird man möglicherweise eine durch die hohe Zuckerkonzentration veranlaßte gesteigerte Permeabilität annehmen müssen. Auch diese Verhältnisse finden in unseren Versuchen an Hunden mit alimentärer Glykämie ein Analogon.

Im einzelnen ergaben die Versuche folgende Befunde:

Fall 6. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48 vor, 40 nach dem Zuckerzusatz.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,072	1,106	0,035
b) nach Zuckerzusatz	0,289	0,384	0,147

Fall 7. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 40.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,049	0,099	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,397	0,554	0,16

Fall 8. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,101	0,121	0.08
b) nach Zuckerzusatz	0,452	0,565	0,32

Fall 9. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 40.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,060	0,099	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,535	0,582	0,46

Fall 10. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 38.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,061	0,046	0,08
b) nach Zuckerzusatz	0,248	0,352	0,08

Fall 11. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,048	0,090	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,451	0,527	0,37

Fall 12. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 38.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,113	0,164	0,03
b) nach Zuckerzusatz	0,420	0,581	0,15

Durch den Nachweis der Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker unter den geschilderten Bedingungen ist dem Vorgange des Zuckeraustausches zwischen Blutkörperchen und Plasma das Rätselhafte genommen. Auch der Ablauf der

Glykolyse ist dem Verständnis näher gerückt. Bekanntlich fehlt im Plasma das glykolytische Ferment, und nach der alten Anschauung sollte wiederum den Blutkörperchen der Zucker fehlen. Der Widerspruch, der dem Verständnis der Glykolyse daraus erwächst, ist nun durch diese und unsere früheren Untersuchungen über diesen Gegenstand behoben. Freilich müssen noch die Bedingungen der teilweisen Permeabilität, wie auch das Verhalten der gewaschenen Blutkörperchen näher studiert werden.

Auf die bemerkenswerte Schrumpfung der Blutkörperchen in dem zuckerhaltigen Medium in mehreren Fällen — wie dies aus den Hämatokritzahlen (vgl. Fall 1 bis 3) zu ersehen ist — gehen wir anläßlich dieser Untersuchung nicht ein, da sie mit der hier erörterten Frage nicht direkt zusammenhängt und die Zuckerwerte der Blutkörperchen nur unwesentlich (und im Sinne eines niedrigeren Zuckergehaltes) verschiebt.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß die roten Blutkörperchen in ihrem natürlichen Medium für Traubenzucker durchgängig sind und ein Widerspruch zwischen der Beobachtung am lebenden Organismus und dem Experiment in vitro nicht besteht.

Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime.

Von

Kiyohisa Yoshimura.

(Aus dem Universitätslaboratorium für Nahrungsmittelchemie in Halle a. S.)

(Eingegangen am 26. Januar 1911.)

I. Die Aminoverbindungen in Malzkeimen.

In einer Arbeit über die Malzkeime hat E. Schulze[1]) bereits berichtet, daß aus Malzkeimen wohl Cholin und Betain, dagegen Arginin und Asparagin trotz aller darauf verwendeten Mühe nicht isoliert werden konnten.

Léger[2]) hat aus Malzkeimen das Alkaloid Hordenin isoliert und untersucht. Es interessierte mich, die Isolierung von Basen, besonders Hexonbasen, sowie Cholin, Betain, Vernin usw. zu wiederholen und die Frage, ob Asparagin in Malzkeimen gänzlich fehlt, zu prüfen; denn es wäre ein gelegentliches Vorkommen hier nicht ausgeschlossen.

Ich konnte nun Histidin, Cholin und Betain, jedoch nicht Arginin, Vernin und Asparagin isolieren.

Die Malzkeime, die für diese Untersuchung benutzt wurden, hatten folgende Zusammensetzung:

Wasser	7,170%
Trockensubstanz	92,830%

---

[1]) E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, 73, 1908.

[2]) Léger, Compt. rend. **142**, 108; **143**, 234 und 916; **144**, 208.

In 100 Teilen Trockensubstanz:

Gesamt-Stickstoff	3,824
Eiweiß-Stickstoff	2,100
Ammoniak-Stickstoff	Spur
Nichteiweiß-Stickstoff	1,724
Davon: durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	0,367
Davon: Stickstoff in anderer Form	1,357
Gesamt-Phosphorsäure	1,185
In Wasser lösliche Phosphorsäure	0,836

Mithin in Prozenten des Gesamt-Stickstoffs:

Eiweiß-Stickstoff	54,93
Ammoniak-Stickstoff	Spur
Nichteiweiß-Stickstoff	45,07
Davon: durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	9,60
Davon: Stickstoff in anderer Form	35,47

Isolierung der organischen Basen.

1 kg lufttrockene zerkleinerte Malzkeime wurde mit heißem Wasser extrahiert und durch ein Tuch koliert; die vereinigten Extrakte wurden mit Bleiessig versetzt und nach 12 Stunden Stehen filtriert. Das Filtrat wurde durch Schwefelwasserstoff entbleit, mit so viel Schwefelsäure angesäuert, bis die Flüssigkeit ungefähr 5% davon enthielt, und endlich mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde nach dem Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure in bekannter Weise mittels Barythydrat zersetzt. Die dabei erhaltene, vom Ammoniak befreite Basenlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert und mit Silbernitrat in mäßigem Überschuß versetzt, wobei ein brauner Niederschlag entstand, der etwa vorhandene Purinbasen enthalten mußte.

A. Die durch Silbernitrat und Barythydrat fällbaren Basen.

Zur Mutterlauge vom Sibernitratniederschlag wurden Silbernitrat und Barythydrat in mäßigem Überschuß zugesetzt. Der dabei entstandene dunkelbraune Niederschlag, der möglicherweise Histidin und Arginin enthalten konnte, wurde nach dem Auswaschen mit verdünntem Barytwasser, unter Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelsilber wurde, nach dem Konzentrieren, mittels Baryts von der Schwefelsäure befreit, durch Kohlensäure der überschüssige Baryt entfernt und endlich im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedunstet. Die so gewonnene alkalische Flüssigkeit wurde, nach der Sättigung mit Kohlensäure, mit einer Quecksilberchlorid-

lösung versetzt, der entstandene Quecksilberchloridniederschlag durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde im Vakuum eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich prismatische Krystalle in sehr kleiner Menge ausschieden, die mit einer alkalischen Lösung von Diazobenzolsulfosäure die Paulysche Reaktion lieferten.

Um etwaige Spuren von Arginin zu entdecken, wurde das Filtrat vom oben erwähnten Quecksilberchloridniederschlag durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und das vorhandene Chlor durch Silbernitrat entfernt.

Zum Filtrat wurden Silbernitrat und Barythydrat in mäßigem Überschuß zugesetzt, der dabei entstandene Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert, im Vakuum eingeengt und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich aber nichts ausschied. Weiter versuchte ich, Spuren von Arginin nachzuweisen, jedoch gelang es mir ebensowenig wie E. Schulze.

B. Die durch Silbernitrat und Barythydrat nicht fällbaren Basen.

Das Filtrat vom Silbernitrat- und Barythydratniederschlag wurde nach dem Entfernen des Silbers durch Salzsäure und des Baryts durch Schwefelsäure, mit Schwefelsäure stark angesäuert und dann mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in üblicher Weise durch Barythydrat zersetzt.

Die so erhaltene freie Basenlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert, langsam eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich farblose Krystalle ausschieden, die sich nach völligem Austrocknen durch Behandeln mit kaltem absolutem Alkohol in folgende zwei Fraktionen trennen ließen.

1. Die in absolutem Alkohol lösliche Fraktion.

Zur alkoholischen Lösung wurde eine alkoholische Lösung von Quecksilberchlorid zugesetzt, hierbei schied sich ein schwerer weißer Niederschlag aus, der im Schmelzröhrchen erhitzt bei 240° C (unkorr.) sich zersetzte.

Der Quecksilberchloridniederschlag wurde im Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt; die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand im Vakuumexsiccator vollständig getrocknet und dann mit ganz wasserfreiem Alkohol behandelt. Die so erhaltene Lösung wurde wieder eingedunstet, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, unter Zusatz von Platinchloridlösung langsam verdampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich allmählich das Platindoppelsalz als orangefarbige Tafeln ausschied, die in kaltem Wasser leicht, in Alkohol fast unlöslich waren. Die Ausbeute betrug ca. 0,4 g. Im Capillarrohre erhitzt, zersetzt es sich bei 235 bis 240° C (unkorr.).

0,1501 g Substanz ergaben . . . . . 0,04755 g Pt

	Gefunden:	Berechnet für Cholinplatinchlorid: $[(C_5H_{14}NO.Cl)_2.PtCl_4]$:
Platin	31,68%	31,84%

Zur weiteren Identifizierung des Cholins wurde ein Teil des Platinates mittels Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelplatin nach dem Abdampfen in das Pikrat übergeführt. Dasselbe schied sich als gelbe glänzende Platten oder Prismen aus, die im Wasser sehr leicht löslich waren und im Schmelzröhrchen sich bei ca. 240° C (unkorr.) zersetzten.

2. Die in absolutem Alkohol unlösliche Fraktion.

Den in kaltem absolutem Alkohol unlöslichen Teil des Gemenges der Chloride behandelte ich mit kochendem 95%igem Alkohol und versetzte die so erhaltene Lösung mit einer alkoholischen Quecksilberchloridlösung, wobei ein weißes Quecksilberdoppelsalz in reichlicher Menge entstand. Das Doppelsalz wurde unter Zusatz von etwas Quecksilberchlorid aus Wasser umkrystallisiert, dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösungen wurden eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich tafelförmige Krystalle ausschieden. Die Ausbeute betrug 0,75 g; im Capillarrohre erhitzt, schmolz das Chlorid unter Schäumen bei 232 bis 234° C (unkorr.).

Das Platindoppelsalz: Ein Teil des Chlorides wurde durch Zugabe von einer Platinchloridlösung in das Platinat übergeführt, das aus orangefarbigen Tafeln entstand und im Wasser leicht, im Alkohol schwer löslich war. Im Capillarrohre erhitzt, schmolz es unter Zersetzen bei 251° C (unkorr.).

0,2368 g Substanz ergaben . . . . . 0,07240 g Pt

	Gefunden:	Berechnet für Betainplatinchlorid $[(C_5H_{11}NO_2.HCl)_2.PtCl_4]$:
Platin	30,57%	30,25%

Das Golddoppelsalz: Einen Teil des Chlorides führte ich in üblicher Weise in das Aurat über, das beim Umkrystallisieren und langsamen Verdunsten einer wässerigen Lösung orangegelbe Nadeln oder Blättchen lieferte, die in kaltem Wasser schwer löslich waren und, im Capillarrohre erhitzt, bei 235° C (unkorr.) schmolzen.

0,4430 g Substanz ergaben . . . . . 0,19020 g Au

	Gefunden:	Berechnet für Betaingoldchlorid $(C_5H_{11}NO_2.HCl.AuCl_3)$:
Gold	42,93%	43,10%

Das Pikrat: Zur Darstellung von Pikrat wurde ein anderer Teil des Chlorides in wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Natriumpikratlösung versetzt, wobei sich gelbe Prismen ausschieden, die in Alkohol kaum, in Wasser leicht löslich waren. Im Capillarrohre erhitzt, schmolz es bei 180 bis 182° C (unkorr.).

Isolierung von Asparagin und Vernin.

1 kg lufttrockene Malzkeime wurde mit heißem Wasser extrahiert, das Extrakt mit Bleiessig versetzt und das durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreite Filtrat mit Mercurinitrat ausgefällt. Dieser Niederschlag wurde nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber getrennte Flüssigkeit wurde im Vakuum eingedunstet, mit Ammoniak neutralisiert und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, um Asparagin und Vernin zu erhalten; aber es gelang nicht, diese Körper zu erhalten, trotzdem ich den Versuch wiederholte.

Zusammenfassung der Resultate.

Aus 1 kg lufttrockenen Malzkeimen wurden isoliert:

Histidin . . .	vorhanden
Cholin . . .	ca. 0,2 g
Betain . . .	ca. 0,6 g
Arginin . . .	nicht vorhanden
Vernin . . .	„ „
Asparagin . .	„ „

II. Die Zuckerarten in Malzkeimen.

(Befindet sich Saccharose in Malzkeimen?)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß bei Keimung von Gerstensamen, unter dem Einfluß der Amylase die Stärke zunächst in Maltose umgewandelt wird, die von dem Aufsaugepithel aufgenommen und weiter in den Zellen des Keimlings in Saccharose umgewandelt wird; nicht die Maltose, sondern die Saccharose dient dem Keimling als Nährstoff. Nach Grüß wird die Maltose aus dem Endosperm von der Aleuronschicht aufgenommen, hier in Saccharose umgesetzt und dem Embryo zugeleitet. Demnach kann man vermuten, daß in Malzkeimen Saccharose vorhanden ist.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurden 200 g lufttrockene Malzkeime mit kochendem 95%igem Alkohol am Rückflußkühler extrahiert, die Extrakte nach Vertreiben des Alkohols im Wasser aufgenommen und mit Bleiessig gereinigt. Das vom Blei befreite Filtrat wurde dann zum Sirup eingedampft, der zu folgenden Versuchen diente:

1. Nach Allihns Methode wurde in 100 Teilen Trockensubstanz der Malzkeime gefunden:

Reduzierender Zucker vor der Inversion (als Invertzucker)	3,366
„ „ nach „ „ „ „	4,643

2. Um die Frage, ob Saccharose in den Malzkeimen vorhanden ist oder nicht, genau zu entscheiden, benützte ich das polarimetrische Verfahren von Jolles[1]). Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip, daß mit Ausnahme der Saccharose alle anderen Zuckerarten durch das Erhitzen mit $^n/_{10}$-Natronlauge optisch inaktiv werden.

Ungefähr 3 g des Sirups wurden mit 50 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge im kochenden Wasserbade am Rückflußkühler $^3/_4$ Stunden lang erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Bleiacetat gefällt, das Filtrat mit Natriumphosphat entbleit, mit Tierkohle entfärbt und dann polarisiert Aber diese Lösung war optisch inaktiv.

3. Ein Teil des Sirups diente zur direkten Bestimmung des Drehungsvermögens. Es ergab sich, daß eine 16,5 %ige Lösung desselben 1,4° nach links (Lippischer Apparat) drehte.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß Saccharose nicht vorhanden war, sondern lediglich Maltose und Invertzucker.

Es ist möglich, daß die Saccharose, die aus der Maltose entstanden war, durch sekundäre Vorgänge wieder invertiert wurde.

Ferner beschäftigte ich mich mit der Isolierung von Inosit, aber alle meine Versuche ließen keine Spur davon erkennen.

---

[1]) A. Jolles, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 20, 631, 1910.

Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern.

Von

B. Slowtzoff.

(Aus der medizinischen Klinik Willie in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Frage nach den chemischen Veränderungen der Leber bei akuter Phosphorvergiftung ist gar nicht neu. Wir wissen schon seit langer Zeit, daß die Einführung von Antimon, Arsen und Phosphor sehr starke fettige Degeneration der Leber und anderer Organe hervorruft. Bei der mikroskopischen Untersuchung solcher Lebern kann man deutlich nachweisen, daß das Protoplasma der Leberzellen von den Fetttröpfchen verschiedener Größe infiltriert ist; diese Infiltration kann allmählich auch die Kernsubstanz angreifen, aber in den meisten Fällen bleiben die Kerne bis zu dem Tode des Tieres wenig verändert und bewahren ihre Farbe.

Seit Virchow nimmt man an, daß die Fettinfiltration der Leber von zwei ganz verschiedenen Prozessen bedingt sein kann. Bei guter Ernährung und nach der Aufsaugung großer Mengen des Fettes aus dem Darmkanal kann man eine Anhäufung des Fettes in der Leber bemerken. Die Menge der Eiweißkörper bleibt aber dabei normal. Bei der fettigen Degeneration korrespondiert die Anreicherung der Leber an Fett einem Zerfall des Protoplasmas und einer Verminderung der Eiweißkörper, so daß es möglich war anzunehmen, daß das Fett gerade aus dem Eiweißkörper entsteht. Eine Reihe von Autoren glaubt aber bewiesen zu haben, daß bei der akuten Leberatrophie das Fett nicht in den Leberzellen entsteht, sondern aus anderen Teilen des Körpers in die Leber transportiert ist. In exquisiten Fällen ist dieser Unterschied zwischen der fettigen Infiltration und fettigen Degeneration sehr deutlich, wie die von Perls (1) angeführten Analysen zeigen.

Die Zusammensetzung der menschlichen Leber (nach Perls).

	Normal	Infiltriert	Degeneriert
Wasser	77,0	61,9	81,6
Trockensubstanz	23,0	38,1	18,4
Fett	2,7	21,7	9,7
Eiweißkörper	21,3	16,4	8,7

Eine Reihe von Analysen, die von Hoeslin (2) gemacht wurden, hat gezeigt, daß eine fettige Degeneration auch bei verschiedenen langdauernden Infektionskrankheiten stattfinden kann. Diese Erscheinung kann durch Toxine oder durch Erhitzung des Körpers hervorgerufen sein.

Man kann auch hier noch die Resultate von Knasters Arbeit (nach Lukjanoff (3) anführen. Dieser Autor hat eine Reihe von Kaninchen mit Phosphoröl vergiftet und die Lebern der gestorbenen Tiere chemisch untersucht. Er gibt folgende Zahlen.

Die Zusammensetzung der Kaninchenleber.

	Normal	Vergiftet
Wasser	71,81	76,63
Trockensubstanz	28,19	23,37
Fett	5,07	6,82
Eiweißkörper	23,12	16,55

Botazzi (3) gibt eine Tabelle von Krüger wieder, aus der ersichtlich ist, daß bei akuter gelber Leberatrophie der Gehalt der Leber an Phosphor, Schwefel und Eisen herabgesetzt ist.

Ausführliche Analysen von Phosphorlebern sind von Waldvogel (4) gemacht. Er hat eine Reihe von Hunden mit verschiedenen Dosen von Phosphor vergiftet, und wenn der erste Hund, der die höchste Gabe bekam, starb, so tötete er alle Tiere, um aus Vergleichen der Zusammensetzung der Leber eine Vorstellung über das Einwirken des Phosphors zu bekommen. Aus seinen Schlüssen sei hier folgendes angeführt. Bei der Phosphorvergiftung steigt die Menge des Alkoholextraktes, der Fettsäuren und des neutralen Fettes, die Lecithine scheinen aber zu zerfallen. Der Verfasser glaubt auch bewiesen zu haben, daß in der Leber eine kleine Menge von Protagon zu finden ist. Die Methodik der Protagonbestimmung war aber sehr dürftig, und Meinertz konnte die Angaben von Waldvogel nicht bestätigen.

Bei der Phosphorvergiftung spielen sich in der Leber eine Menge von proteolytischen Prozessen ab, was Jacoby (7) auch experimentell bewiesen hat. Aus den Bestimmungen des Ammoniaks und der Eiweißkörper in der aseptisch aufbewahrten Leber konnte er feststellen, daß in der Phosphorleber die Autolyse viel schneller verläuft.

Aus der Arbeit von Wakeman (8) über den Gehalt der Hexonbasen in der mit Phosphor vergifteten Leber sieht man, daß mit dem Abbau der Eiweißkörper auch die Menge der Diaminosäuren vermindert

wird. Wenn wir noch die Arbeit von Almagia und Duceschi (9) über den Gehalt der normalen und degenerierten Leber an lipolytischen und oxydierenden Fermenten (kein Unterschied gefunden) anführen, so wäre damit die Literatur über die chemische Veränderung der Phosphorleber, wenn wir die Angaben über den Fettgehalt unberücksichtigt lassen, erschöpft.

Aus dieser kurzen Zusammenstellung der Literaturangaben sieht man, daß unsere Kenntnisse in dieser Frage noch sehr dürftig sind, und ich hielt es für lohnend, in dieser Hinsicht einige neue Versuche zu machen.

Es wurden dazu 11 Hunde genommen, die gleichmäßig (mit Pferdefleisch und Roggenbrot) ernährt wurden. 5 davon dienten als Kontrolltiere, die übrigen wurden mit Phosphoröl vergiftet (0,5 ccm pro 1 kg) bis zu dem Tode, der ungefähr nach 6 bis 10 Tagen eintrat. Die Leber wurde mit Ringer-Lockscher Lösung durch die Pfortader sorgfältig vom Blut befreit, dann zwischen Fließpapier vom Wasser befreit, gewogen, in der Hackmaschine in Brei verwandelt und chemisch untersucht. Ein Teil des Breies wurde in ganz dünner Schicht auf Glasplatten gestrichen und bei 37° C getrocknet. Die getrocknete Masse wurde gepulvert, aufbewahrt und auf Fermentgehalt untersucht. Die vorläufigen Versuche haben uns gezeigt, daß bei solcher Bearbeitung der Fermentgehalt fast gar nicht verändert wird.

Wir wollen zuerst die Zahlen über das Gewicht der Leber bei normalen und vergifteten Hunden zusammenstellen.

	Kontrolltiere						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
Gewicht des Hundes in kg	9,2	8,7	7,4	8,5	10,0		
Gewicht der Leber in g	400	310	250	290	430		
Verhalten der Leber .	0,43	0,36	0,33	0,34	0,43		0,36
	Vergiftete Tiere						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
Gewicht des Hundes in kg	7,2	7,4	7,6	11,2	8,0	7,6	
Gewicht der Leber in g	220	240	244	250	225	197	
Verhalten der Leber .	0,31	0,32	0,32	0,22	0,28	0,27	0,25

Man sieht, daß bei der Phosphorvergiftung der Leber merklich eine Atrophie eintritt, so daß das Gesamtgewicht der Leber nur 0,25% des Körpergewichtes ausmacht.

Die Analyse des getrockneten Leberpulvers auf Trockensubstanz, Asche, Fett (Ätherextrakt) und Rest (Eiweißkörper) hat uns folgende Zahlen geliefert. Wir haben einigemal den Glykogengehalt der Leber bestimmt, aber er war sehr klein und in einigen Fällen gleich Null, so

daß wir wirklich den Rest der organischen Substanz (nach Abzug der Fettmenge) als Eiweißkörper annehmen können.

Zusammensetzung der Leber.

	Kontrolltiere						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
Trockensubstanz . .	25,53	24,92	24,92	24,10	25,10		24,91
Asche	0,82	1,22	0,66	0,70	0,85		0,85
Organische Substanz .	24,71	23,70	24,26	23,40	24,25		24,06
Fette	4,63	4,82	4,28	5,59	6,80		5,36
Eiweißkörper	20,08	19,88	19,88	17,81	17,55		18,70
	Vergiftete Tiere						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
Trockensubstanz . .	20,52	17,32	28,35	31,00	28,32	23,08	24,76
Asche	0,72	0,71	1,67	1,80	0,93	0,67	1,08
Organische Substanz .	19,80	16,61	26,68	29,20	27,39	22,41	23,69
Fette	9,68	9,04	6,08	14,49	16,20	9,42	10,82
Eiweißkörper	10,12	7,57	20,60	14,71	11,19	12,99	12,86

Der Wasser- und Aschegehalt der Leber während der Phosphorvergiftung ist normal, die Menge des Restes (resp. Eiweißkörper) wurde bedeutend niedriger (von 18,7 bis auf 12,86%). Der Fettgehalt war fast verdoppelt (10,82 anstatt 5,36%). In einigen Fällen, wie zum Beispiel Nr. 9 und 10, betrug der Fettgehalt 14,49 und sogar 16,20%, also mehr als ein Drittel der Trockensubstanz.

Diese relative Vermehrung des Fettes und die Verminderung der Eiweißkörper tritt noch deutlicher hervor, wenn wir die absoluten Werte des Fettes und der Eiweißkörper in der Leber von Hunden derselben Größe zusammenstellen.

Gewicht des Fettes und der Eiweißkörper in der Leber.

Nr.	Gewicht des Tieres	Normaltiere		Nr.	Gewicht des Tieres	Vergiftete Tiere	
		Fett	Eiweiß			Fett	Eiweiß
3	7,4	12,45	49,70	6	7,2	21,30	22,26
				7	7,4	21,70	18,17
				8	7,6	16,59	30,66
				10	7,6	18,55	15,61
2	8,7	14,94	60,63	11	8,0	36,45	25,20
4	8,5	17,21	51,65				
1	9,2	18,52	80,92				
5	10,0	29,24	75,42	9	11,2	36,22	36,80

Um die Veränderungen der Eiweißkörper näher zu studieren, haben wir den gesamten Stickstoff in einige Fraktionen geteilt. Im ganzen konnte man leicht folgende 5 Fraktionen erhalten: 1. N der wasserlöslichen

Eiweißkörper (Albumine und Globuline), 2. N des in Wasser löslichen Nucleoproteids, 3. N des in 1‰iger Essigsäure löslichen Eiweißes, 4. N des in 1‰igem NaHO löslichen Nucleoproteids und 5. N des Restes (Stroma), der mikroskopisch aus Kernen und aus einer kleinen Menge Bindegewebe besteht. Da die Resultate ziemlich identisch waren, so begnügten wir uns mit 3 normalen und 3 Werten von vergifteten Tieren. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammenegstellt.

Fraktion	Normaltiere				Vergiftete Tiere			
	Nr. 1	2	3	Mittel	Nr. 6	7	8	Mittel
1	4,40	3,15	4,10	3,90	1,70	2,10	2,05	1,95
2	5,68	10,36	7,80	7,95	2,80	3,12	4,10	2,50
3	2,84	2,70	2,80	2,78	2,85	3,15	3,00	3,00
4	56,88	55,85	56,10	56,28	58,10	59,20	61,10	59,47
5	30,20	27,94	29,10	29,09	34,55	32,43	29,75	33,05

Im allgemeinen bleibt die Stickstoffverteilung fast normal. Nur die Menge des wasserlöslichen Nucleoproteids sinkt bedeutend: von 7,95 bis 2,50%. Worauf das beruht, ist nicht ersichtlich; die Tatsache ist aber auch später mehrmals mit anderen Methoden bestätigt worden.

Um eine Vorstellung über den Zerfall von phosphorhaltigen Eiweißkörpern zu bekommen, haben wir in dem mit Äther extrahierten Leberpulver, wo die Lecithine und Phosphatide ausgezogen waren, die Verteilung des Stickstoffes studiert und nach Kossels Methode die Menge der Xanthinkörper bestimmt.

Die Resultate dieser Analyse sind in der Tabelle zusammengestellt, und man kann deutlich bemerken, daß die degenerierten Lebern reicher an P_2O_5 und Xanthinkörpern sind. Bei dem Zerfall der Zellen ist also die Nucleingruppe viel beständiger und bleibt bis zu dem Tode des Tieres wenig angegriffen, N und P_2O_5 sind in Prozenten des getrockneten und entfetteten Pulvers wiedergegeben.

Die Verteilung des N und P_2O_5 in der Leber.

	Kontrolltiere				Vergiftete Tiere				
	Nr. 1	2	3	Mittel	Nr. 7	9	10	11	Mittel
Gesamt-N	11,26	8,42	8,20	9,19	8,81	14,45	13,61	14,10	12,74
N des Wasserextraktes	2,22	1,08	1,07	1,86	2,81	2,02	2,17	3,37	2,59
N der Eiweißkörper .	9,04	7,34	6,93	7,33	6,00	12,25	11,44	10,73	10,15
N der Xanthinkörper	0,731	0,757	0,684	0,724	1,270	2,000	1,650	1,660	1,640
Gesamt-P_2O_5	4,31	2,52	3,14	3,32	3,98	4,59	5,90	4,90	4,84
P_2O_5 des Wasserextraktes	1,37	1,29	1,88	1,51	1,53	1,08	1,46	1,49	1,39
P_2O_5 der Eiweißkörper	2,94	1,23	1,26	1,80	2,45	3,47	4,44	3,41	3,45

Es bleiben noch die Resultate des Fermentgehaltes in Leberpulvern zu erwähnen. Wir haben darin die Menge der Peroxydase (nach der Menge des aus Wasserstoffsuperoxyd gebildeten O), der Protease (nach Fermi) und Amylase (nach Wohlgemuth) bestimmt. Gewöhnlich wurde 0,1 g des Pulvers genommen, die Resultate sind aber um das zehnfache vermehrt, also auf 1 g der Leberpulver berechnet.

1 g der getrockneten Leber kann:

	Normalleber						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
O-Abspaltung in ccm .	454	438	474	480	520		473
Gelatine gelöst in g .	1,00	2,50	1,66	1,00	1,00		1,65
Stärke in Achroodextrin übergeführt in g . .	0,50	0,37	0,39	0,35	0,35		0,39
	Vergiftete Leber						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
O-Abspaltung in ccm .	322	350	360	240	304	320	316
Gelatine gelöst in g .	1,00	1,70	1,00	1,00	1,80	1,00	1,08
Stärke in Achroodextrin übergeführt in g . .	0,60	1,00	0,66	0,66	0,66	1,00	0,76

Bei der Phosphorvergiftung scheint also die Menge der Peroxydase und der Protease zu sinken, die der Amylase aber zu steigen. Die Tatsachen, daß die Menge des proteolytischen Fermentes sinkt und die autolytischen Prozesse in der Phosphorleber stärker verlaufen, sind schwer miteinander zu vereinbaren. Es bestehen hier zwei Möglichkeiten. Proteolytische (gelatinelösende) und autolytische Fermente können verschieden sein, oder die Reaktion des Leberbreies ist nach der Phosphorvergiftung saurer, und dadurch kann der autolytische Prozeß sich schneller entwickeln, obgleich die absolute Menge des Fermentes doch kleiner ist. Uns scheint diese zweite Erklärung der Wahrheit näher zu stehen, da die Reaktion der Phosphorleber merklich saurer ist als die der normalen Leber.

Wenn wir kurz alles tatsächliche Material zusammenstellen, so können wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der akuten Phosphorvergiftung wird das Gewicht der Leber kleiner.

2. Bei dieser Leberatrophie steigt die Menge des Fettes; die Eiweißkörper zerfallen.

3. Dieser Zerfall hängt hauptsächlich von dem Abbau von nicht phosphorhaltigen Eiweißkörpern ab.

4. Aus den Nucleoproteiden wird am stärksten das wasserlösliche Nucleoproteid angegriffen.

5. Die Phosphorleber enthält weniger Peroxydase und Protease und mehr Amylase.

Literatur.

1. Perls, Lehrbuch der allgem. Pathol., 1886.
2. Hoeslin, Arch. f. klin. Med. 33, 600, 1883.
3. Lukjanoff, Grundriß der allgemein. Pathol. (Russ.).
4. Botazzi, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1903.
5. Waldvogel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 200, 1904.
6. Meinertz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 371, 1905.
7. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 174, 1900.
8. Wakeman, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 335, 1908.
9. Almagia und Ducceschi, Arch. di Pharmacol speriment, 2, 1, 1903 (nach Maly).

Über die chemischen Veränderungen in der Leber bei einigen pathologischen Prozessen.

Von

B. J. Slowtzoff und L. W. Ssobolew.

(Aus der medizinischen Klinik Willie in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Zusammensetzung der Leber ist nur in ganz groben Zügen bekannt. Viel besser sind ihre Funktionen, die sehr mannigfaltig in chemischem Sinne sind, erforscht. Das allgemeine Ziel aller dieser chemischen Prozesse ist, soweit wir wissen, die Bearbeitung verschiedener Substanzen, die aus dem Darme in den Leberkreislauf gelangen. Die Leberzellen, die auf dem Wege zwischen den Darmkanal und dem allgemeinen Kreislauf stehen, werden viel mehr als andere Zellen des Körpers von diesen Giften angegriffen und altern sehr früh. Unter der Wirkung der starken Gifte, wie Phosphor oder Arsen, gehen die Leberzellen sehr schnell zugrunde, und das ganze Tier stirbt bald unter Erscheinungen von sogenannter gelber akuter Leberatrophie; bei den chronischen Vergiftungen sterben die Leberzellen nur allmählich und werden durch Wucherung anderer Zellarten, am meisten von Bindegewebselementen, ersetzt.

Es schien interessant, an Leichenmaterial die Beziehungen zwischen den pathologischen, mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der Leber und den chemischen Veränderungen festzustellen. Obgleich diese Beziehungen vom theoretischen Standpunkte aus ganz verständlich sind, scheint, soweit es uns bekannt ist, das tatsächliche Material dazu nur sehr dürftig zu sein. Wir haben uns entschlossen, eine gesamte Bearbeitung des Leichenmaterials vom mikroskopischen und chemischen

Standpunkte aus zu machen. Das Schema der Untersuchung war folgendes:

Die Leber stammte von Leichen, die nach gewöhnlichen Regeln im pathologischen Institut seziert waren. Es wurden auch ca. 20 bis 50 ccm des Blutes aus dem Herzen als Probe genommen. Die Leber wurde mit einem scharfen Messer in möglichst feine Lamellen zerteilt und mit Fließpapier vom Überschuß des Blutes abgepreßt, dann mit der Fleischhackmaschine möglichst zerkleinert. Ein Teil dieses ziemlich homogenen Breies wurde auf Trockensubstanz, Stickstoff, Arten der Eiweißkörper untersucht, das andere auf Glasplatten in möglichst dünnen Schichten aufgestrichen und bei 37° C im Thermostat getrocknet. Nach 18 Stunden konnte man die Masse leicht von dem Glas abkratzen und pulvern. Dieses Pulver wurde in Glasgefäßen aufbewahrt und für die Bestimmung der Fermente benutzt.

In solchen Präparaten konnte man alle fermentativen Funktionen der Leber feststellen, wie es Wiechowski für Uricase und wir für Protease, Amylase und Peroxydase feststellen konnten.

Aus unseren Versuchen können wir als Beispiel den Versuch Nr. 40 hier anführen.

Nr. 40, Leber Nr. 56. 20 g frische Leber wurden während 24 Stunden mit 100 ccm Wasser digeriert. Trockensubstanz ergab sich zu 24,5%. Wir nahmen 4,9 g getrocknete Leber und digerierten sie mit 115 ccm Wasser. Die beiden Infuse wurden abfiltriert und erwiesen sich gleich stark. 2 ccm dieses Extraktes führten während 24 Stunden 10 ccm des 0,5%igen Stärkekleisters in Achroodextrin über und lösten 10 ccm 5%iger Gelatine.

Nun kam aber die Frage, inwieweit das Blut, das in dem Pulver geblieben war, auf den Fermentgehalt des Organs wirkt. Wir haben deswegen einige Versuche mit dem Fermentgehalt des Blutes und mit dem Gehalt des Blutes in den Organen ausgeführt. Als Beispiel dieser Reihe von Versuchen sei folgendes Protokoll hier angeführt:

2,5 g des Leberbreies wurden mehrmals mit Wasser extrahiert. Alle Extrakte wurden abfiltriert, zusammengemischt und auf 1 Liter aufgefüllt. Die Farbe dieses Extraktes wurde mit dem verdünnten Blute derselben Person im Großschen Colorimeter verglichen. Man konnte feststellen, daß 100 ccm dieses Extraktes 0,011 ccm des Blutes entsprechen, so daß wir in den 2,5 g der Leber nur 0,11 g Blut haben. Nun wurden 10 ccm 5%iger Gelatine und 0,5 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure in eine Reihe von Reagensgläsern getan und dazu der Leberextrakt und die dem Leberextrakt entsprechende wässerige Lösung des Blutes gefügt (0,11 ccm des Blutes auf 1000 ccm).

Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Auf 10 ccm 5%iger Gelatinelösung wirkten während 48 Stunden

Kubikzentimeter des Extraktes	Leberextrakt	das der Leber entsprechende Blut
0,5	–	–
0,75	–	–
1,00	–	–
1,25	–	–
1,50	+	–
1,75	+	–
2,00	+	–
2,25	+	–
2,50	+	+

Bei unseren Versuchen sieht man deutlich, daß die gelatinelösende Wirkung des Blutes viel schwächer ist als die der Leber, und wir glauben, daß die Veränderungen in der gelatinelösenden Kraft der Leberextrakte viel mehr auf die Leber als auf das Blut zu beziehen sind. Diese Tatsache entspricht den Resultaten des Versuches von Borchert, der zeigen konnte, daß die amylolytische Kraft der Leber auch stärker als die des Blutes ist.

Die Bestimmung der Fermente in der getrockneten und pulverisierten Leber bezog sich hauptsächlich auf die Menge der Peroxydase, der Amylase und der Protease. Die proteolytische Wirkung wurde nach Fermi aus der Menge der gelösten Gelatine ermittelt, die Menge der Amylase aus der Menge des Leberextraktes, der eine bestimmte Menge der Stärke in Achroodextrin überführen konnte (nach Wohlgemuth). Die katalytische Wirkung der Leber wurde aus der Menge des gebildeten Sauerstoffes (aus bestimmten Mengen des Wasserstoffsuperoxyds) berechnet.

Was die Bestimmung der Trockensubstanz und der fettartigen ätherlöslichen Substanzen und der Asche betrifft, so wurden sie nach den gewöhnlichen analytischen Methoden bestimmt. Wir hielten es auch für erwünscht, die verschiedenen Eiweißstoffe der Leber zu isolieren, und haben dafür folgende Methodik ausgearbeitet:

Es wurden ungefähr 4 bis 5 g des Leberbreies abgewogen und mehrmals mit destilliertem Wasser extrahiert; alle Extrakte wurden abfiltriert und zusammengemischt; nach 3 bis 4 Extraktionen mit ca. 200 bis 250 ccm konnte man alle in Wasser löslichen Eiweißkörper extrahieren. Der Extrakt wurde bis auf 1000 ccm verdünnt und dann der N nach

Kjeldahl bestimmt. Ein Teil des Extraktes wurde sehr schwach mit Essigsäure angesäuert und 24 Stunden stehen gelassen, bis alle Nucleoproteide ausfallen. Im Filtrate wurde wieder der N bestimmt; ein Teil des Filtrates wurde gekocht, von allen Eiweißkörpern (Albumine und Globuline) befreit und das Filtrat wieder auf den Stickstoffgehalt untersucht. Der mit Wasser extrahierte Rückstand der Leber wurde mit 1‰iger Essigsäure extrahiert. In den meisten Fällen konnte man damit eine geringe Anzahl Eiweißkörper extrahieren, deren Menge wieder durch Stickstoffbestimmungen (nach Kjeldahl) ausgedrückt werden kann. Der Rückstand wurde wieder mit 1‰igem NaHO mehrmals extrahiert und in diesem Extrakt wieder der Stickstoff bestimmt.

Aus allen diesen N-Bestimmungen kann man den gesamten Stickstoff der Leber in einige Fraktionen teilen. 1. Gesamtstickstoff; 2. N der Extraktivstoffe; 3. N der Albumine und Globuline; 4. N des in Wasser löslichen Nucleoproteides; 5. N der in 1‰iger Säure gelösten Eiweißkörper; 6. N des in 1‰igem NaOH löslichen Nucleoproteids und 7. der Rest, den wir vorläufig Stroma nennen werden. Da diese Analysen ziemlich lange Zeit dauerten, so schien es uns interessant, die Grenzen der Fehler zu bestimmen. Als Beispiel seien die Resultate zweier parallel gemachter Bestimmungen angeführt.

	Bestimmung Nr. 1	Bestimmung Nr. 2
Gesamt-N	2,670	2,640
N der Extraktivstoffe	0,821	0,747
N der Albumine und Globuline	0,465	0,527
Wasserlösliche Nucleoproteide	0,184	0,176
In 1‰iger Essigsäure lösliche Eiweißkörper	0,082	0,085
In 1‰igem NaOH lösliche Nucleoproteide	1,002	0,995
Stroma (berechnet)	0,106	0,100

Wir können hier einige Resultate unserer Versuche an Lebercirrhosen und luetischen Lebern anführen, da das übrige Material noch nicht zahlreich genug ist. Als Vergleich dienten uns die Lebern von Personen, die an verschiedenen Krankheiten gelitten haben, deren Lebern jedoch nach pathologisch-anatomischen Untersuchungen als normal befunden waren.

Wir haben 5 Lebern als Kontrolle genommen: Nr. 94 (Strictura Oesophagi), Nr. 9 (Phthisis pulmonum), Nr. 131 (Cancer mammae), Nr. 104 (Pleuritis purulenta); Nr. 1 (Pyaemia). Die zu diesen Fällen gehörenden Zahlen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
Gewicht des Körpers (kg)	45,9	58,8	39,3	73,8	40,0	
Gewicht der Leber . . .	0,98	1,7	1,4	1,65	1,1	1,38
Verhalten des Gewichtes der Leber zu dem Gewichte des Körpers . .	2,13	2,9	3,6	2,3	2,8	2,74
Blutgehalt in der Leber in %	5,0	4,8	3,5	2,0	2,8	3,6

Das mittlere Gewicht der Leber betrug also 1380 g, was ziemlich normal ist. Das Gewicht der Leber war im Mittel 2,74% des Körpergewichtes. Der Gehalt der getrockneten Lebern an Fermenten ist in folgender Tabelle zusammengestellt und so ausgedrückt (durch Berechnen), daß man daraus die Stärke der peroxydativen, amylolytischen und autolytischen Kraft der Leber pro 1 g Substanz ersieht.

	Extrakt aus 1 g Leber					
	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
bildet O in ccm	312	316	342	342	240	316
verflüssigt Gelatine in g .	2,0	2,50	3,3	2,50	2,00	2,46
löst Stärke in g	0,2	0,25	0,2	0,35	0,20	0,22

Daraus ist ersichtlich, daß der Fermentgehalt aller Lebern dieser Reihe ziemlich gleichmäßig war.

Die Zusammensetzung dieser Lebern stellte sich in folgender Weise dar:

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
Trockensubstanz	27,67	28,54	28,10	27,59	24,56	27,29
Asche	0,63	1,00	0,84	0,85	1,18	0,90
Organische Substanz . .	27,04	27,54	27,26	21,74	23,38	26,34
Fette (ätherlöslich) . . .	9,53	5,30	12,60	6,30	5,62	7,34
Eiweißkörper	17,51	22,24	14,66	20,44	17,76	19,05

Die Verteilung des Stickstoffes in den Lebern ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
N der Extraktivstoffe . .	15,8	8,0	11,8	13,0	9,2	11,4
N der Albumine und Globuline	13,5	19,6	10,0	6,0	10,0	11,8
N des wasserlöslichen Nucleoproteids . . .	4,9	2,8	6,9	6,9	9,8	6,2
N der in 1‰iger Säure löslichen Eiweißkörper	15,5	7,4	10,0	11,8	10,0	10,0
N der in 1‰igem NaHO löslichen Eiweißstoffe .	31,7	32,1	35,0	47,2	40,0	35,2
Stroma	34,7	38,0	38,1	31,0	31,0	35,9

Die Summe der zwei ersten Fraktionen entspricht ziemlich gut dem Blutgehalt der Leber.

	Gesamt-N der Extraktivstoffe und der Albumine und Globuline	Gehalt des Blutes in % der Leber
Nr. 94	29,3	5,0
Nr. 9	27,6	4,8
Nr. 131	21,8	3,5
Nr. 104	19,0	2,0
Nr. 1	19,2	2,8

Die zweite Gruppe unserer Lebern bezieht sich auf Cirrhosen verschiedener Art. Nr. 56, 52, 58, 96 und 120.

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 96	Nr. 120	Mittel
Gewicht des Körpers (kg) .	64,8	46,0	62,3	61,8	89,6	
Gewicht der Leber	1,45	1,28	1,32	1,47	2,09	1,52
Verhalten der Leber zu dem Körpergewicht	2,24	2,52	2,12	2,38	2,33	2,3
Blutgehalt in %	4,2	5,4	5,6	2,0	5,6	4,6

Im Mittel war also das Gewicht der Leber 1522 g und betrug 2,3% des Gesamtgewichtes des Körpers.

Die Resultate des Fermentgehaltes sind folgende:

	1 g der Leber					
	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 96	Nr. 120	Mittel
bildet O in ccm	274	274	380	145	290	275
verflüssigt Gelatine in g . .	2,20	2,10	2,00	2,50	2,00	2,17
löst Stärke in g	0,27	0,27	0,25	0,25	0,30	0,27

Man sieht deutlich, daß die Menge der Peroxydase und des gelatinelösenden Fermentes im ganzen niedriger ist, die amylolytische Kraft scheint aber in den normalen Grenzen zu bleiben.

Wenn wir nun die Resultate der gewöhnlichen Zusammensetzung unserer Lebern, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind, betrachten, so sehen wir, daß die Menge der Trockensubstanz in dieser ganzen Reihe niedrig ist und nur in einem Falle, wo man bei der mikroskopischen Untersuchung eine Wucherung des Bindegewebes fand, etwas höher als in der Norm. Parallel dem erhöhten Wassergehalt der Leber sank der Fettgehalt von den mittleren 7,34% bis auf 4,43%; solche Beziehungen zwischen dem Wasser- und Fettgehalt der Organe

sind mehreremal in verschiedenen pathologischen Zuständen angedeutet. Die Menge der Eiweißkörper scheint normal zu bleiben; der Aschegehalt wird etwas größer, was in gewissem Sinne vielleicht auf den erhöhten Gehalt der Leber an Blut zu beziehen ist.

Die Zusammensetzung der cirrhotischen Lebern.

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 76	Nr. 120	Mittel
Trockensubstanz	25,64	21,73	27,12	21,06	23,80	24,70
Asche	1,39	0,90	1,67	0,84	1,62	1,48
Organische Substanz . . .	24,25	20,73	25,45	20,22	22,18	23,22
Fette	5,99	3,61	3,16	3,63	6,05	4,49
Eiweißkörper	18,26	17,12	22,49	16,59	16,13	18,73

Die Verteilung der verschiedenen Stickstoffformen kann man sich folgendermaßen vorstellen:

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 76	Nr. 120	Mittel
N der Extraktivstoffe . . .	18,2	22,0	14,1	16,4	16,6	19,5
N der Albumine u. Globuline	29,15	22,90	24,44	7,82	17,60	18,27
N des wasserlöslichen Nucleoproteids	7,44	8,70	7,68	6,45	5,30	7,38
N der in 1‰iger Säure löslichen Eiweißkörper	7,50	8,21	7,25	7,32	4,47	6,95
N der in 1‰igem NaHO löslichen Eiweißkörper	38,63	55,02	46,83	63,59	50,27	52,67
Stroma	12,47	17,15	13,82	14,98	13,40	18,03

Bei den Stauungserscheinungen mit dem Wassergehalt der Organe steigt die Menge der Extraktivstoffe und der Albumine und Globuline bedeutend, was natürlich mit dem Blutgehalt der Leber in engster Beziehung steht. Sehr bedeutend verminderte sich die Fraktion der Stroma von 36,9% bis auf 15,03% des Stickstoffes.

Diese Verminderung des Stickstoffes der Stroma scheint uns in einer Beziehung zu der Verminderung der Kernsubstanz zu stehen.

Wenn wir nun die Haupterscheinungen bei den Stauungslebercirrhosen zusammenstellen, so kann man sich folgendes Bild vorstellen. Die Menge des Wassers steigt, und damit wird auch die Menge der Extraktivstoffe und der Asche niedriger; der Fettgehalt sinkt. Aus verschiedenen Eiweißkörpern der Leberprotoplasma wird die Kernsubstanz ver-

mindert, und ihr Fermentgehalt (hauptsächlich) an Peroxydase sinkt unter die normalen Grenzen.

Aus unserem Material seien noch einige Resultate über syphilitische Lebern zusammengestellt. 4 mal wurde das Material direkt den Leichen entnommen und 3 mal erhielten wir das Material schon in getrocknetem Zustande (als Antigene für Wassermanns Reaktion).

Die allgemeine Zusammensetzung ist in folgender Tabelle wiedergegeben:

	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	α	β	γ	δ	Mittel
Trockensubstanz . .	22,94	25,91	26,10	26,10	25,80	24,0	26,2	25,29
Asche	1,13	0,58	0,62	—	0,70	—	—	0,75
Organische Substanz	21,81	25,33	25,48	—	25,10	—	—	24,54
Fette	2,86	7,34	6,30	4,80	—	4,30	—	5,02
Eiweißkörper . . .	18,95	16,99	19,18	—	—	—	—	19,52

Die Zusammensetzung der luetischen Lebern scheint im ganzen ziemlich normal zu sein. Nur der Wassergehalt ist etwas größer.

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung in der Lebersubstanz in drei Fällen, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind, gibt auch fast normale Werte.

Die Verteilung des Stickstoffes in der Leber.

	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	Mittel
N der Extraktivstoffe	3,7	2,3	2,6	2,9
N der Albumine und Globuline . .	5,5	15,70	15,70	12,2
N des in Wasser löslichen Nucleoproteids	9,2	4,0	2,61	5,3
N des in 1‰iger Essigsäure löslichen Eiweißes	12,4	8,3	13,96	11,5
N des in 1%igem NaHO löslichen Eiweißes	44,1	34,3	37,8	38,7
Stroma	28,2	37,7	29,94	32,3

Es bleiben noch einige Zahlen über den Fermentgehalt der syphilitischen Lebern anzuführen.

	1 g der Leber						
	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	α	β	γ	Mittel
bildet O in ccm	78	264	35,2	38,4	200,0	80,0	236
verflüssigt Gelatine in g .	0	0	0,6	1,00	0,6	0	0,35
löst Stärke in g	0,33	0,33	0,25	0,28	0,30	0,32	0,31

Bezüglich des Fermentgehalts sind die luetischen Lebern sehr interessant. Die Menge der Peroxydase ist im Mittel normal, bietet aber sehr große individuelle Schwankungen. Die Menge der Protease war in drei Fällen gleich Null. Diese Erscheinung steht in einem gewissen Zusammenhang mit der Tatsache, die von Dr. Minz[1]) in unserer Klinik festgestellt wurde, daß in dem Blut von Luetikern die Menge des Antitrypsins unter die normale Grenze sinkt.

Wir haben deswegen vergleichende Bestimmungen der proteolytischen und amylolytischen Kraft des normalen und luetischen Blutserums gemacht. Im Mittel kann 1 ccm des Blutserums von normalen Menschen 0,2 g Stärke in Achroodextrin überführen und 0,5 g Gelatine lösen. Das Blutserum, bei dem die Wassermannsche Reaktion positiv ausfiel, konnte nur 0,1 g Stärke und 0,25 g verarbeiten.

Uns scheint, daß wir aus den angeführten Versuchen folgende Schlüsse ziehen können:

1. Es ist sehr wünschenswert, die gleichzeitige morphologische, pathologisch-anatomische und chemische Untersuchung bei Organen zu machen.

2. Die kleine Menge des in der Leber enthaltenen Blutes scheint ohne besondere Wirkung auf die Resultate der chemischen Untersuchung zu sein, was den Fermentgehalt betrifft, da das Zellenprotoplasma viel reicher an Fermenten als das Blut ist.

3. Bei der Stauungscirrhose geht parallel den mikroskopischen Veränderungen in der Balkenstruktur der Leberzellen und der Degeneration der Leberzellen eine Vermehrung des Wassergehaltes der Lebergewebe; die Menge des Fettes sinkt unter die Norm. Die Leber wird reicher an Extraktivstoffen und ärmer an Nucleinen und Peroxydase.

4. In der Leber der Luetiker bleibt die Zusammensetzung der Leber fast normal. Der Fermentgehalt scheint sich aber bedeutend zu vermindern.

---

[1]) Minz, Russki Wratsch 1910, Nr. 5.

Studien über die Wirkungen des Kobragiftes.

Von

Ivar Bang und E. Overton.

(Aus dem medizinisch-chemischen und dem pharmakologischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 25. Januar 1911.)

Einleitung.

Die vorliegende Untersuchung über die Wirkungen des Kobragiftes, die im Frühjahr 1910 ausgeführt wurde, kam folgendermaßen zustande:

Der eine von uns (Bang) hatte sich schon früher vielfach mit den hämolytischen Wirkungen des Kobragiftes beschäftigt, während der andere im Jahre 1909 gefunden hatte, daß Kaulquappen ein vorzügliches Versuchsobjekt bieten, um die verschiedenen Wirkungen des Kobragiftes, namentlich die Wirkungen auf das Zentralnervensystem, zu studieren, indem diese Vergiftungserscheinungen, selbst noch in sehr weit vorgeschrittenen Stadien der Vergiftung, in demselben Sinne reversibel sind wie die narkotischen Wirkungen von Äther oder Chloroform. Wie bei den letztgenannten Verbindungen entsprechen die Vergiftungssymptome ganz bestimmten Konzentrationen des Kobragiftes in den die Kaulquappen umspülenden Lösungen.

Kaulquappen können infolgedessen (wie bei zahlreichen Lösungen anderer Verbindungen) als quantitative Indicatoren für bestimmte Konzentrationen des Kobragiftes (resp. jenes Bestandteils desselben, der auf das Zentralnervensystem wirkt) in einer Lösung verwendet werden, wobei aber natürlich der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Vergiftungsprozeß zunächst studiert werden muß.

Wir haben dann gemeinsam einen Arbeitsplan für die vorliegende Untersuchung besprochen, einen Plan, der freilich infolge der relativ kurzen Zeit, während der Kaulquappen in den günstigsten Entwicklungsstadien zur Verfügung standen, nur teilweise durchgeführt werden konnte.

In der Ausführung der Versuche wurde die Arbeit so verteilt, daß Overton vorwiegend die in Kapitel I und III beschriebenen Versuche sowie die Versuche über den Einfluß der Neutralsalze und der Sera, die im dritten Kapitel behandelt werden, ausführte, während Bang die Mehrzahl der Versuche im Kapitel IV und die Versuche über den Einfluß der alkalisch reagierenden Verbindungen, die im Kapitel III beschrieben sind, übernahm.

Zu allen Versuchen in dieser Arbeit wurden Kaulquappen von Rana fusca (Rana temporaria der Autoren) verwendet. Der Laich wurde im Freien gesammelt, sobald die beginnende gleichmäßige Entwicklung der Eier durch das unbewaffnete Auge konstatiert werden konnte. Verfügt man nicht über Apparate, wie sie bei der künstlichen Fischzucht in Anwendung kommen, so züchtet man die Kaulquappen am besten in großen, flachen Glasschalen, wobei die Laichklumpen teilweise zu zerschneiden und flach auszubreiten sind. Das Wasser ist, sofern man die Züchtung nicht in immer fließendem Wasser vornehmen kann, häufig zu erneuern. Ganz zweckmäßig ist der tägliche Zusatz von etwas reinem Wasserstoffsuperoxyd, jedoch so, daß die Konzentration desselben nach der Mischung nicht mehr als 1:5000 beträgt.

Nachdem die Mehrzahl der Kaulquappen aus den Gallertklumpen ausgeschlüpft sind und sich an den Rändern der Schale angesammelt haben, werden sie mittels einer Glasröhre in eine neue Schale mit Leitungswasser übergeführt.

Speziell für Versuche mit Kobragift sind Kaulquappen von 14 bis 18 mm Länge die günstigsten. Kaulquappen von mehr als 20 mm Länge sind kaum brauchbar, da die Sterblichkeit unter ihnen im Laboratorium recht groß ist und sie eine viel geringere Gleichmäßigkeit aufweisen.

Alle toten Kaulquappen sind so bald als möglich zu entfernen, teils weil sie die Entwicklung von Bakterien in den Kulturen befördern, teils weil sie von ihren Geschwistern aufgefressen werden. Da, wenn letzteres eintritt, ein Teil der Kaulquappen Gelegenheit hat, Nahrung aufzunehmen, andere nicht, so wird die Gleichmäßigkeit der Kulturen gestört und die Versuchslösungen werden durch Exkremente stark verunreinigt.

Das Dottermaterial genügt vollständig für die Entwicklung, bis die Kaulquappen eine Länge von über 18 mm erreicht haben, obgleich, wenn sie dazu Gelegenheit haben, sie bald nach dem Ausschlüpfen zu fressen anfangen.

Eine Stunde oder mehr vor der Anwendung zu Versuchszwecken werden einige Kaulquappen in destilliertes Wasser übergeführt und dieses Wasser häufig erneuert, so daß es immer rein bleibt. Auch die Maßkulturen sind so rein und bakterienfrei wie möglich zu halten.

Aus dem destillierten Wasser werden die Kaulquappen in die Versuchslösungen übergeführt, die ebenfalls mit destilliertem Wasser bereitet

werden müssen. Alle Überführungen von Kaulquappen aus einem Gefäß in ein anderes haben mit Glasröhren zu geschehen, deren unterer Rand glattgeschmolzen ist. Die Kaulquappen werden so wenig wie möglich direkt berührt, um eine Verletzung der Hautepithelien zu vermeiden, die namentlich bei jungen Kaulquappen gegen mechanische Insulte sehr empfindlich sind.

Von größter Bedeutung ist, nur solches Wasser zu verwenden, das (bei der letzten Destillation) nur mit Glasgefäßen in Berührung gekommen ist. Man redestilliert am besten das gewöhnliche destillierte Wasser in Jenakolben, wobei das Destillat auch in Jenakolben aufgefangen wird und die Kühlung der Dämpfe durch einen Glaskühler erfolgt.

Das gewöhnliche destillierte Wasser ohne Redestillation in Glasgefäßen ist bei allen etwas länger dauernden Versuchen mit Kaulquappen, kleinen Fischen oder dünnen Muskeln (Frosch-Sartorii) zur Bereitung der Versuchslösungen oder zum Aufbewahren der Kaulquappen oder Fische vor dem Beginn der Versuche völlig unbrauchbar, da es meist schon nach kurzer Zeit (häufig schon innerhalb 1 bis 2 Stunden oder noch kürzerer Zeit) junge Kaulquappen infolge eines geringen Gehalts an Kupfer oder anderen Schwermetallen tötet. Dies muß immer wieder betont werden, da man noch heute in der wissenschaftlichen Literatur über Muskelversuche u. dgl. nicht selten am Schlusse der Arbeit die Angabe findet, daß die Lösungen mit gewöhnlichem destilliertem Wasser bereitet wurden, da ein Vorversuch gezeigt hatte, daß dies nicht schädlich wirkte. Dazu ist zu bemerken, daß der Umstand, daß gewöhnliches destilliertes Wasser gelegentlich nicht oder nur wenig schädlich wirkt, absolut keine Garantie bietet, daß Wasser, in denselben Apparaten destilliert, auch ein anderes Mal unschädlich sein wird. Es ist leicht einzusehen, daß dies auf einer Menge nicht näher kontrollierbarer Umstände beruhen wird, wie z. B. darauf, ob zufällig ein Teil des Wassers längere Zeit mit dem Kühler oder der Vorlage in Berührung gewesen ist oder nicht usw. Tatsache ist, daß Wasser, das in den gewöhnlichen metallenen Destillationsapparaten destilliert worden ist, in den meisten Fällen schädlich wirkt, was die Resultate von Versuchen, bei denen derartiges Wasser zur Bereitung der Lösungen verwendet worden ist, durchaus unzuverlässig macht. Dies gilt aber natürlich nur dann, wenn die Versuchsobjekte, wie bei allen unseren Versuchen, mit relativ großen Mengen der Lösungen in Wechselwirkung kommen, während bei Injektionen von wenigen Kubikzentimetern Lösung in ein Tier, das über 100 g wiegt, es im wesentlichen gleichgültig sein wird, ob man gewöhnliches oder in Glasapparaten destilliertes Wasser zur Bereitung der Lösungen verwendet.

Bei genaueren Versuchen kann man nicht Leitungswasser zur Bereitung der Lösungen benutzen, da, wie wir später sehen werden, schon äußerst geringe Mengen Kalksalze in der Lösung die Versuchsresultate beeinflussen.

In Wasser, das in Glasgefäßen destilliert worden ist, leben Kaulquappen wochenlang, ohne Störungen aufzuweisen.

Vor der Überführung der Kaulquappen in die Versuchslösungen müssen diese durch Schütteln mit Luft oder reinem Sauerstoff gesättigt werden. Die günstigsten Versuchstemperaturen sind 10 bis 18° C. Temperaturen über 20° sind viel weniger günstig, namentlich bei solchen Versuchen, wo eine vollständige Lähmung des Zentralnervensystems eintritt. Bei diesen höheren Temperaturen werden nämlich Kaulquappen, wenn ihre Respirationsbewegungen aufgehört haben, nicht mehr genügend mit Sauerstoff versehen. Es wäre ganz zweckmäßig, bei solchen höheren Temperaturen eine Sättigung der Lösungen mit Sauerstoff statt mit Luft vorzunehmen. Einer der Hauptvorteile der Kaulquappen als Versuchsobjekte liegt eben in dem Umstande, daß sie bei nicht zu hoher Temperatur und bei reichlichem Gehalte der Lösungen an gelöster Luft resp. an gelöstem Sauerstoff selbst bei aufgehobenen Respirationsbewegungen tagelang leben können, indem die Hautepithelien, die z. T. aus flimmernden Zellen aufgebaut sind, eine zur Unterhaltung des Lebens genügende Menge Sauerstoff aufzunehmen vermögen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung genügt es meist, die Kaulquappen in einer Petrischale mit wenig Lösung bei einer 100fachen Vergrößerung zu besichtigen. Will man stärkere Vergrößerungen anwenden, so untersucht man im hängenden Tropfen. Bei ganz jungen Kaulquappen von R. fusca kann man meist nur die Zirkulationsverhältnisse im Schwanze, den Lippen usw. leicht wahrnehmen, bei etwas älteren, wo das Pigment weniger gleichmäßig verteilt ist, kann man das Herz sehr gut direkt beobachten.

Zur Bereitung der übrigen Kobragiftlösungen wurde stets eine $1\,^0/_{00}$ige Stammlösung benutzt. Diese wurde alle 8 Tage frisch bereitet und im Eisschrank aufbewahrt. Innerhalb 8 Tagen nimmt die Wirksamkeit einer solchen Lösung um weniger als $10\,^0/_0$ ab.

Das zu den Versuchen verwendete Kobragift verdanken wir der großen Güte und Liberalität des Direktors des Seruminstituts in Kopenhagen, Herrn Dr. Madsen, und wir möchten ihm dafür auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Schließlich ist zu bemerken, daß wir über die wichtigsten Resultate dieser Untersuchung am 31. Mai 1910 einen Vortrag in Lunds Läkaresällskap hielten, bei welcher Gelegenheit einige der Hauptversuche demonstriert wurden (z. B. die normale Fortdauer der Zirkulation bei Kaulquappen, die in Kobragiftlösungen von 1:600000 und 1:800000 seit 24 Stunden verweilt hatten und deren Zentralnervensystem inklusive des Respirationszentrums völlig gelähmt war; die Aufhebung der Giftwirkungen relativ starker Kobragiftlösungen durch Anwesenheit von $0{,}2\,^0/_0$igem $CaCl_2$ in den Lösungen; die Aufhebung der Vergiftung durch Antivenin; die starke Speicherung des „Neurotoxins“ durch rote Blutkörperchen usw.). Ein Autoreferat über diesen Vortrag erschien in der schwedischen Zeitschrift „Hygiea“.

Kapitel I.

Über das Verhalten von jungen Kaulquappen nach der Überführung in mit destilliertem Wasser bereiteten Kobragiftlösungen von ungleicher Konzentration.

Unter Kobragift ist in den folgenden Versuchen wie überall in dieser Abhandlung das gesamte getrocknete Sekret der Giftdrüsen zu verstehen, und ebenso z. B. unter einer 1‰igen Kobragiftlösung eine Lösung zu verstehen, die bereitet wird durch Auflösung von 1 Teil des getrockneten Sekrets in 999 Teilen Wasser. Da das Sekret der Giftdrüsen einen hohen Prozentsatz indifferenter Verbindungen (hauptsächlich Proteinsubstanzen) enthält, so wird die wirkliche Konzentration der wirksamen Verbindung oder der wirksamen Verbindungen eine noch viel geringere sein als die in den einzelnen Versuchen angegebene Gesamtkonzentration an dem getrockneten Sekret, was sehr zu beachten ist. Solange zuverlässige Angaben über den Gehalt des Sekrets an wirksamer Substanz fehlen, hat man keine andere Methode, die Stärke der verwendeten Lösungen anzugeben. Die verschiedenen Proben des von uns benutzten Kobragiftpräparats zeigten sich durchaus gleichmäßig stark wirksam.

Wenn man 12 bis 15 mm lange Kaulquappen von Rana fusca aus destilliertem Wasser in 0,2 bis 1‰ige Lösungen von Kobragift überführt, so sterben sie schon nach wenigen Minuten, und kurze Zeit darauf zerfallen die Hautepithelien. Versuche mit solchen stärkeren Lösungen sollen an anderer Stelle mitgeteilt werden, und deren nähere Beschreibung kann hier unterbleiben; dagegen wird es von Vorteil sein, einige Versuche etwas ausführlicher wiederzugeben, die mit Lösungen von 1 : 25000 bis 1 : 100000 Kobragift angestellt wurden, weil dieselben für die Beurteilung der Geschwindigkeit des Überganges der eigentlichen giftigen Bestandteile des Kobragiftes von größerer Bedeutung sind, obgleich selbst Lösungen von diesen geringen Gehalten ziemlich rasch tödlich auf die Kaulquappen wirken und auch die Hautepithelien allmählich direkt angreifen. Wie sich später ergeben wird, zeigen sich die resorptiven Wirkungen des Kobragiftes in ihrer vollen Reinheit erst bei noch bedeutend geringeren Konzentrationen als 1 : 100000.

Versuch mit 1:25000 Kobragift.

Um 6^{34} p. m. des 4. VI. 1910 wurden zwei 17 bis 18 mm lange Kaulquappen von Rana fusca in 10 ccm einer Lösung von 1:25000 Kobragift (in destilliertem Wasser) übergeführt. Temp. $20^1/_2{}^0$ C.

Um 6^{41} p. m., also schon nach 7 Minuten, beide Kaulquappen fast bewegungslos.

Um 6^{48} p. m. (14 Minuten nach Beginn des Versuchs) die eine Kaulquappe völlig unerregbar, die andere nur noch eben merklich erregbar.

Zwischen 7 und 7^{05} p. m. mikroskopisch untersucht, zeigte sich die Zirkulation bei beiden Kaulquappen noch vorhanden, aber ziemlich langsam. Keine Respirationsbewegungen der Kiemen, aber die Zirkulation in den Gefäßen der Kiemenblätter noch gut erhalten, Herzbewegungen direkt sichtbar.

Um 7^{30} p. m., also schon nach weniger als 1 Stunde vom Beginn des Versuchs, beide Kaulquappen tot; Hautepithelien im Zerfall begriffen.

Versuch mit Kaulquappen in 1:50000 Kobragift.

Um 6^{35} p. m. d. 4. VI. 2 Kaulquappen in 20 ccm 1:50000 Kobragift, in dest. Wasser gelöst, übergeführt. Kaulquappen 18 mm lang, Temp. $20^1/_2{}^0$ C.

Um 6^{48} p. m. Bewegungen bereits beeinträchtigt.

Um 6^{51} p. m. beide Kaulquappen schon sehr stark gelähmt, aber doch noch etwas erregbar.

Um 6^{55} p. m. beide völlig gelähmt und unerregbar.

Um 7^{30} p. m. tot.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:100000, 1:200000 und 1:300000 Kobragift.

Um 7 p. m. des 23. IV. 1910 wurden je 3 Kaulquappen von ca. 15 mm Länge in a) 1:100000, b) 1:200000 und c) 1:300000 Kobragift, in dest. Wasser gelöst, übergeführt. Jedesmal wurden 40 ccm Lösung verwendet. Temp. 14° C.

Um 8^{15} p. m. des 23. IV. waren die Kaulquappen in Lösung a) alle schon gelähmt, die in Lösung b) ziemlich träge.

Um 9^{30} p. m. des 23. IV. alle Kaulquappen in Lösung a) völlig unbeweglich, mit mehr oder weniger beschädigten Hautepithelien.

Um 9^{45} p. m. des 23. IV. (also nach $2^3/_4$ Stunden) kann eine Kaulquappe in der Lösung b (1:200000) sich noch etwas bewegen, die Bewegungen sind aber sehr träge; die zwei anderen Kaulquappen in b) sind unbeweglich, aber mit gut erhaltener Zirkulation.

Um 9^{50} p. m. des 23. IV. Kaulquappen in c) (1:300000) noch etwas beweglich, aber recht träge.

Am nächsten Morgen (24. IV.) alle Kaulquappen in a), b) und c) tot, die in a) und b) mit teilweise abgestoßenen Hautepithelien. In c) sind die Hautepithelien weniger beschädigt als in a) und b).

Besonders interessant ist der folgende Versuch, der daher ausführlich mitgeteilt werden soll.

Versuch mit Kaulquappen in einer Lösung von 1:400000 Kobragift in destilliertem Wasser.

Um 7^{05} p. m. des 23. IV. wurden drei 15 mm lange Kaulquappen von Rana fusca in 40 ccm einer Kobragiftlösung von 1:400000 übergeführt. Temp. 14° C.

Um 9^{55} p. m. des 23. IV. (also nach fast 3 Stunden) alle 3 Kaulquappen etwas beweglich, Bewegungen aber sehr träge, Kaulquappen sonst gut aussehend.

Am nächsten Morgen um 10^{00} a. m. (also nach 15 Stunden, vorher nicht untersucht) alle 3 Kaulquappen völlig unerregbar, aber recht gut aussehend, Zirkulation vorzüglich, keine Atmungsbewegungen.

Um 7^{02} p. m. d. 24. IV., also 24 Stunden nach Beginn des Versuchs, Zirkulation bei allen 3 Kaulquappen immer noch vorzüglich, aber Kaulquappen völlig unerregbar.

Darauf (7^{05} p. m.) wurden 2 dieser Kaulquappen (a) in reines Wasser übergeführt. Die dritte Kaulquappe (b) wurde in der Lösung zurückgelassen.

Noch um 2^{30} p. m. des 27. IV., also $67\frac{1}{2}$ Stunden nach Überführung in reines Wasser, waren die beiden Kaulquappen (a) völlig unbeweglich und ohne Atmungsbewegungen, aber mit sehr gut erhaltener Zirkulation.

Um 11^{58} p. m. des 27. IV. diese 2 Kaulquappen etwas erregbar; sie bewegen sich schwach, wenn angerührt.

Am Morgen des 28. IV. beide Kaulquappen bedeutend besser beweglich als bei der letzten Beobachtung, aber selbst noch um 7^{30} p. m. d. 28. IV. etwas träger als normal, jedoch im übrigen gesund.

Am Morgen des 29. IV. beide völlig normal, spontan beweglich.

Die in der Lösung zurückgelassene Kaulquappe (b) war um 7^{30} p. m. d. 28. IV. immer noch völlig unerregbar und ohne Atmungsbewegungen, aber mit sehr gut erhaltener Zirkulation. Sie starb erst nach 1 Woche nach Beginn des Versuchs.

Eine nähere Diskussion dieses Versuchs soll erst weiter unten im Zusammenhang mit den anderen Versuchen vorgenommen werden.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:600000, 1:800000 und 1:1000000 Kobragift.

Um 8^{10} p. m. des 23. IV. wurden je 3 Kaulquappen von 15 mm Länge in a) 1:600000, b) 1:800000 und c) 1:1000000 Kobragift übergeführt. Jede Lösung betrug 40 ccm. Temp. 14° C.

Um 10^{10} p. m. des 23. IV. (also nach 2 Stunden) alle Kaulquappen in a), b) und c) noch ziemlich gut beweglich.

Um 11^{10} a. m. des 24. IV. (also nach 15 Stunden) alle Kaulquappen in Lösung a) völlig unerregbar, aber sehr gut erhalten und mit lebhafter Zirkulation.

Um 11^{15} a. m. des 24. IV. 1 Kaulquappe in Lösung b) (1:800000) etwas beweglich, die 2 anderen völlig unbeweglich, aber gut aussehend. Etwas später auch die 3. Kaulquappe völlig gelähmt.

Um 11^{20} a. m. des 24. IV. Kaulquappen in c) noch beweglich, aber recht träge. Selbst um 10^{52} p. m. d. 24. IV. (also nach $26^1/_2$ Stunden) Kaulquappen in c) noch gelegentlich mit äußerst trägen, kriechenden Bewegungen, die aber am folgenden Morgen völlig aufhören.

Um 9^{00} p. m. des 24. IV., also 25 Stunden nach Beginn des Versuchs und wenigstens 9 Stunden nach Eintreten vollständiger Unerregbarkeit, wurden 2 Kaulquappen aus der Lösung b) (1:800000) in reines Wasser übergeführt. Diese blieben völlig unerregbar bis zum Abend des 26. IV., also noch ca. 48 Stunden, worauf die Erregbarkeit sehr langsam zurückkehrte. Am Morgen des 27. IV. waren sie immer noch recht träge und selbst am Abend dieses Tages noch nicht völlig erholt. Am Morgen des 28. IV. dagegen bewegten sie sich wieder völlig normal.

Von den Kaulquappen, die in den 3 Lösungen a), b), c) zurückgelassen wurden, zeigten die in c) (1:1000000) schon am 27. IV. wieder einen geringen Grad Erregbarkeit, ebenso am Abend des 28. IV. die in der Lösung b) zurückgelassene Kaulquappe und schließlich auch die in Lösung a) (1:600000) gelassenen Kaulquappen.

Die im letzten Versuche beschriebene Erscheinung, daß Kaulquappen in Lösungen, die nicht viel stärker sind als gerade zur vollständigen Lähmung hinreichen, schließlich wieder erregbar werden können, selbst wenn sie in den Lösungen dauernd verweilen, wenn auch sehr viel langsamer als nach der Übertragung in Wasser, könnte die Vermutung erwecken, daß die Kaulquappen sich allmählich an die Kobragiftlösungen in dem Sinne gewöhnen, daß nach längerer Zeit der Einwirkung eine höhere Konzentration des Kobragiftes zur Lähmung erforderlich ist als im Anfang der Wirkung. Diese Deutung ist aber nicht die richtige, da bei der Einführung neuer Kaulquappen z. B. in eine Lösung von 1:800000, in der die zuerst eingesetzten Kaulquappen wieder etwas erregbar geworden sind, auch die frisch eingeführten Kaulquappen nie vollständig gelähmt werden, sondern sogar stets etwas schwächere Lähmungserscheinungen aufweisen, als die zuerst eingesetzten im gleichen Zeitpunkte zeigen. Wenn man ferner Kaulquappen, die z. B. in einer Lösung von 1:800000 oder 1:1000000 völlig gelähmt worden sind, aber nach einigen Tagen wieder erregbar geworden, in frisch bereitete Lösungen von denselben Konzentrationen überführt, so tritt wieder vollständige Lähmung

ein. Die ganze Erscheinung beruht also darauf, daß die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes in sehr verdünnten Lösungen, wahrscheinlich meist unter Mitwirkung von Bakterien, allmählich, wenn auch recht langsam, zersetzt werden.

Versuch mit sehr jungen Kaulquappen in 1:500000 Kobragift.

Um 3^{45} p. m. d. 9. IV. 1910 5 Kaulquappen von R. fusca, die erst eine Länge von 12 bis 13 mm hatten (gleich nach Verlust der äußeren Kiemen), in 25 ccm Kobragiftlösung von 1:500000 gesetzt. Temp. der Lösung 13 bis 14° C.

Um 5^{00} p. m. (also nach $1^1/_4$ Stunden) schon recht träge.

Um 6^{50} p. m., d. h. 3 Stunden und 5 Minuten nach dem Beginn des Versuchs, 4 Kaulquappen bereits völlig gelähmt, die 5. noch etwas beweglich.

Um 7^{00} p. m. und später Zirkulation bei den völlig gelähmten Kaulquappen noch vorzüglich, und auch die Flimmerbewegung der Hautepithelzellen gut erhalten.

Um 8^{00} p. m. war auch die 5. Kaulquappe völlig gelähmt.

Am nächsten Morgen alle Kaulquappen noch mit vorzüglicher Zirkulation.

Dieser Versuch wurde nicht weiter protokolliert. In 2 gleichzeitig mit dem eben beschriebenen angestellten Versuchen mit Kaulquappen in 1:1000000 (25 ccm) und in 1:1500000 (38 ccm) Kobragift trat selbst nach vielen Tagen keine Lähmung ein; in der ersten Lösung zeigten sich die Kaulquappen nur etwas träge.

Bei Anwendung von nur 40 ccm Lösung und 4 Kaulquappen ist eine Lösung von 1:1000000 die schwächste, die vollständige Lähmung herbeiführt. Wenn man aber 200 bis 500 ccm Lösung und nur 4 bis 6 Kaulquappen zu den Versuchen verwendet, so erhält man nach 20 bis 30 Stunden bei 15 bis 18 mm langen Kaulquappen und einer Temperatur von 16 bis 20° C eine vollständige oder fast vollständige Lähmung noch bei einer Konzentration von 1:1500000, die aber nach 30 bis 40 weiteren Stunden unvollständig wird und in der Folge immer mehr, wenn auch langsam, abnimmt, was, wie schon oben hervorgehoben wurde, auf einer langsamen Zersetzung der wirksamen Bestandteile in der Lösung beruht, wodurch die Konzentration in der Außenlösung unter den kritischen Wert sinkt, wobei mit kritischer Konzentration die geringste Konzentration, die gerade ausreicht, vollständige Lähmung herbeizuführen, bezeichnet werden soll. Da in der

Zeit zwischen Beginn des Versuchs und dem Entstehen der Lähmung ebenfalls eine merkliche Konzentrationsänderung des wirksamen Bestandteils[1]) der Lösung stattfinden wird, so würde die wirkliche kritische Konzentration des Kobragiftes etwas niedriger als 1:1500000 liegen, und bei der Annahme, daß der wirksame Bestandteil nur 5% des Kobragiftes (des gesamten getrockneten Sekrets) ausmacht, würde die kritische Konzentration dieses Bestandteils etwas weniger als 1:30000000 betragen.

Im vorhergehenden sind die Protokolle von nur einem kleinen Bruchteil der ausgeführten Versuche mitgeteilt; alle übrigen Versuche stimmten in ihren wesentlichen Ergebnissen mit den geschilderten überein, nur ist zu bemerken, daß die Kaulquappen in völlig gelähmtem Zustande weit länger leben können und sich regelmäßiger erholen bei Temperaturen unter 16° C als z. B. bei Temperaturen über 20° C. Bei Temperaturen von 22 bis 24° C sterben sie häufig noch in Lösungen von 1:600000 und selbst noch in 1:800000 schon 8 bis 10 Stunden nach Eintreten der Lähmung oder selbst noch früher. Die kritische Konzentration bleibt annähernd gleich für Kaulquappen zwischen 12 und 20 mm Länge, doch sind im allgemeinen Kaulquappen zwischen 15 und 18 mm die geeignetsten für Versuchszwecke. Sehr junge Kaulquappen scheinen für die lokalen Wirkungen der stärkeren Kobragiftlösungen auf die Hautepithelien etwas empfindlicher zu sein als etwas ältere (solche von 15 mm und darüber). Die ungünstige Wirkung höherer Temperaturen bei den Versuchen beruht wahrscheinlich wenigstens zum Teil darauf, daß bei dem gesteigerten Sauerstoffbedürfnis und der geringeren Konzentration des in der Lösung befindlichen freien Sauerstoffs (Abnahme des Absorptionskoeffizienten bei höherer Temperatur) die Kaulquappen bei aufgehobenen Atmungsbewegungen nicht mehr genügend mit Sauerstoff versehen werden. Dabei ist zu bemerken, daß die Lösungen vor Beginn der Versuche nur mit Luft, nicht mit reinem Sauerstoff gesättigt wurden.

---

[1]) Später mitzuteilende Versuche machen es wahrscheinlich, daß alle wichtigeren toxischen Wirkungen des Kobragiftes von einer einzigen Verbindung in demselben ausgehen.

Ehe wir zur Diskussion der aus den obigen Versuchen zu ziehenden Schlüsse schreiten, ist noch auf ein äußerst wichtiges Verhältnis aufmerksam zu machen. Es wird wohl aufgefallen sein, daß trotz des sehr geringen Gewichtes der bei den Versuchen verwendeten Kaulquappen (Kaulquappen von 12 bis 18 mm Länge wiegen in frischem Zustande nur ca. 12 bis 20 mg) relativ große Mengen Lösung (40 ccm oder darüber) in Anwendung kamen. Dies ist durchaus notwendig, wenn die Konzentration der Lösung während des Versuchs sich nicht wesentlich ändern soll. Es zeigte sich nämlich, daß eine sehr starke „Speicherung" des wirksamen Bestandteils des Kobragiftes von seiten der Kaulquappen erfolgt, d. h. daß im Zustande des Gleichgewichts zwischen dem Gehalt der äußeren Lösung und den Gehalten der verschiedenen Phasen, aus denen die Kaulquappen aufgebaut sind, an dem wirksamen Bestandteil des Giftes die mittlere Konzentration dieses Bestandteils (in gelöster und chemisch gebundener Form) im Kaulquappenkörper weit größer ist als in der die Kaulquappen umgebenden Lösung. Das Verhältnis der Konzentration der toxischen Verbindung in der Außenlösung zur mittleren Konzentration im Kaulquappenkörper ist zweifellos bei ungleich weit entwickelten Kaulquappen ein mehr oder weniger verschiedenes, da die Größenzunahme der Kaulquappen, wenn man letztere wie in unseren Versuchen nüchtern aufzieht, unter Aufzehrung und Assimilation des Dottermaterials größtenteils auf Wasseraufnahme beruht. Selbstverständlich wird im Zustande des Gleichgewichts im allgemeinen die Konzentration der toxischen Verbindung (in freier und chemisch gebundener Form) ebenso viele Ungleichheiten aufweisen, wie es Phasen von ungleicher Zusammensetzung im Aufbau der Kaulquappen gibt; deren mittlere Konzentration also z. B. nicht nur ungleich für das Blut, für die verschiedenen Kategorien Neurone und für eine quergestreifte Muskelfaser ausfallen, sondern auch ungleich sein in den einzelnen Phasen verschiedener Zusammensetzung, aus denen das Blut, die Muskelfasern und die verschiedenen Klassen der Neurone aufgebaut sind.

Daß eine starke Speicherung der toxischen Verbindung in den Kaulquappen im angedeuteten Sinne wirklich erfolgt, läßt sich äußerst einfach auf dem folgenden Wege nachweisen:

Man stelle 20 ccm Kobragiftlösung mit einer Konzentration von 1:150000 her, teile diese Lösung in 2 gleiche Portionen von je 10 ccm. Diese 2 Portionen seien bezeichnet als A und B. Man nehme nun ca. 60 kleine, lebende Kaulquappen, die zusammen ca. 1 g wiegen, in 9 g Wasser, so daß Kaulquappen und Wasser vereint 10 g wiegen. Man mische dieses Wasser nebst den darin enthaltenen Kaulquappen mit der Lösung A. Nach der Mischung mag diese neue Lösung A′ heißen. Die Kobragiftkonzentration in A′ ist dann im Anfang 1:300000.

Die Lösung B verdünne man mit 30 ccm Wasser, und sie sei nach dieser Verdünnung B′ genannt. Die Kobragiftkonzentration in B′ ist dann 1:600000. Man überführe nunmehr 2 oder 3Kaulquappen aus destilliertem Wasser in diese Lösung B′.

Innerhalb einiger Stunden werden die 2 oder 3 Kaulquappen in B′ vollkommen gelähmt, indem die Konzentration dieser Lösung trotz einer gewissen Verdünnung des Giftes infolge Speicherung desselben durch die Kaulquappen immer höher als der kritische Wert bleibt, weil das Verhältnis des Volumens der wenigen Kaulquappen zum Volumen der Lösung hier sehr klein ist. Dagegen kommt es niemals zu einer vollständigen Lähmung der 60 Kaulquappen in der ursprünglich konzentrierteren Lösung A′, weil sie so viel Gift aus der Lösung aufnehmen, daß die Konzentration der letzteren unter 1:1500000, d. h. unter den kritischen Wert sinkt.

Die Speicherung des toxischen Bestandteils des Kobragiftes durch verschiedene Gewebe und Zellen kann in analoger Weise bestimmt werden, indem man Kaulquappen als „quantitative Indicatoren" verwendet, wie im Kapitel IV für die roten Blutkörperchen gezeigt werden soll.

Wenn Gleichgewicht zwischen 15 mm langen Kaulquappen und einer sie umgebenden Lösung, die (nach eingetretenem Gleichgewicht) 1:1500000 Kobragift enthält, besteht, so ist die mittlere Konzentration des wirksamen Bestandteils in den Kaulquappenkörpern ca. 100mal größer als in der Außenflüssigkeit. Dabei kann die Konzentration dieses Bestandteils in freier oder chemisch gebundener Form in einzelnen Phasen der Kaulquappen vielleicht 10000mal höher, in anderen Phasen dagegen niedriger als in der Außenlösung sein. Die

Details dieser Versuche, die schon vor $1^1/_2$ Jahren in größerer Zahl ausgeführt wurden, finden sich an anderer Stelle publiziert.

Diskussion der Ergebnisse der in diesem Abschnitt mitgeteilten Versuche nebst einigen Zusätzen.

Wenn man das relativ rasche Eintreten der vollständigen Lähmung junger Kaulquappen selbst in sehr verdünnten Lösungen von Kobragift und gleichzeitig die starke Speicherung berücksichtigt, so ergibt sich, daß die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes außerordentlich leicht durch die Haut- und Kiemenepithelien der Kaulquappen in die pericapillaren Räume der Haut- und Kiemenblutgefäße diffundieren müssen, um ebenso schnell durch die Capillarendothelien in das Blut dieser Organe zu gelangen. Durch den Blutstrom weiter nach den Blutcapillaren der übrigen Organe geführt, exosmiert der größere Teil der giftigen Substanz durch die Capillarendothelien der einzelnen Organe zunächst in die intercelluläre Lymphe dieser Organe, um gleich weiter in die einzelnen Zellen, z. B. die verschiedenen Zellen des Zentralnervensystems, zu diffundieren und sich hier über die einzelnen Phasen dieser Zellen nach den Gesetzen der Diffusion in heterogenen Systemen zu verteilen, wobei die Verhältnisse vielleicht noch dadurch eine Komplikation erfahren, daß die giftige Substanz mit dem einen oder anderen Komponenten einer oder mehrerer Phasen dissoziierbare Verbindungen eingeht.

Enthalten die Kobragiftlösungen weniger als etwa 1:400000 oder 1:600000 Kobragift, so geschieht dies alles, ohne daß die Haut- und Kiemenepithelien irgendwie beschädigt werden.

Vergleichende Versuche über die Geschwindigkeit des Eindringens zeigen, daß, für gleiche Diffusionsgefälle zwischen Außenlösung und dem Blutplasma der Haut- und Kiemengefäße berechnet, die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes mindestens ebenso schnell, wahrscheinlich sogar noch schneller durch die lebenden, unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien resp. durch die Capillarendothelien diffundieren müssen als Chloralhydrat[1]), dagegen etwas langsamer als die meisten anderen

[1]) Daß Chloralhydrat langsamer als die meisten anderen indifferenten Narkotica aufgenommen wird, hat Overton in seinen Studien über die Narkose gezeigt.

Narkotica. Das Eindringen muß sehr viel rascher sein als das von Glycerin oder Harnstoff.

Daß das Eindringen in den Körper wirklich durch die Haut- und Kiemenepithelien und nicht etwa vom Darmkanal aus erfolgt, ergibt sich ohne weiteres aus der Größe der Aufnahme während eines kürzeren Zeitraumes. Aus einer Lösung von 1:500000 Kobragift wird nämlich schon innerhalb 5 bis 6 Stunden von einer einzigen Kaulquappe eine Menge der toxischen Substanz aufgenommen, die erst in einem Volumen der Lösung enthalten ist, das 50mal größer ist als das Volumen der Kaulquappe. Daß eine derartige Menge Lösung von einer Kaulquappe in 6 Stunden verschluckt werden soll, ist ausgeschlossen; ja es ist sehr unwahrscheinlich, daß eine Kaulquappe überhaupt trinkt außer mehr zufälligerweise bei der Aufnahme von fester Nahrung. Das für das Wachstum notwendige Wasser wird durch die Haut- und Kiemenepithelien aufgenommen. Im übrigen erfolgt die Aufnahme der toxischen Bestandteile des Kobragiftes ebenso leicht bei Kaulquappen schon in der ersten Zeit nach dem Ausschlüpfen aus der Eihaut, ehe überhaupt die Mundöffnung vorhanden, resp. ehe diese in Kommunikation mit dem Darmkanal getreten ist, wie durch spezielle Versuche festgestellt wurde.

Dieses sehr rasche Eindringen der wirksamen Substanz des Kobragiftes, das unzweifelhaft ein reiner Diffusionsvorgang ist, ohne daß dabei irgendwelche aktive Beteiligung des Protoplasmas der Kiemen- und Hautepithelien stattfindet, dürfte mit der weitverbreiteten Ansicht unvereinbar sein, daß diese Substanz zu den Proteinkörpern gehört. Eine Anhäufung von Amino- und Iminogruppen in einem Molekül, wie eine solche in den Proteinen besteht, benimmt nämlich dem Molekül die Fähigkeit, auf reinem Diffusionswege (d. h. ohne aktive Beteiligung des Protoplasmas) durch die lebende Plasmahaut zu dringen. Aus ähnlichen Gründen ist auch das Vorhandensein einer größeren Anzahl Hydroxylgruppen im Molekül der Substanz sehr unwahrscheinlich, es sei denn, daß die Zahl der Hydroxylgruppen von der der Kohlenstoffatome bei weitem übertroffen wird.[1]) Dagegen kann aus dem sehr raschen

[1]) Vgl. Overton in Nagels Handb. d. Physiol. 2, 819 bis 824, oder in Pflügers Archiv 92, 261 bis 264, 1902.

Eindringen keineswegs geschlossen werden, daß das Molekulargewicht der Substanz ein niedriges sein muß, da viele hoch molekularen Verbindungen (z. B. die basischen Anilinfarben, die freien Alkaloidbasen) die lebende Plasmahaut sehr leicht und rasch passieren, wenn nur keine zu große Anhäufung von Hydroxyl-, Amino- oder Iminogruppen im Molekül vorhanden ist.

Ein sehr wichtiges Ergebnis der Versuche ist, daß die Vergiftung durch Kobragift genau in demselben Sinne ein vollständig reversibler Vorgang ist wie z. B. eine normal verlaufende Narkose.

Wie bei der Narkose durch Äther oder Chloroform bedarf es zur vollständigen Lähmung des Zentralnervensystems durch Kobragift einer ganz bestimmten, angebbaren Minimalkonzentration der wirksamen Substanz in der Außenflüssigkeit, nachdem ein Gleichgewichtszustand zwischen dieser Konzentration und den Konzentrationen der Substanz in den verschiedenen Phasen, aus denen die Neurone aufgebaut sind, eingetreten ist.

Wenn die Konzentration der wirksamen Substanz in der Außenflüssigkeit unter den betreffenden Minimalwert sinkt, beginnt zunächst ein Teil des im Blutplasma der Kaulquappen befindlichen Giftes den Diffusionsgesetzen entsprechend durch die Haut- und Kiemenepithelien in die Außenflüssigkeit überzutreten, was seinerseits zu einem teilweisen Austritte des in den Neuronen und anderen Zellen der Kaulquappen enthaltenen Gifts in das Blut und zu einer allmählichen Entgiftung der Kaulquappen führt. Werden die Kaulquappen in reines und gelegentlich gewechseltes Wasser übergeführt, so wird die Entgiftung nach längerer Zeit eine ganz vollständige.

In einem gewissen Sinne kann man geradezu sagen, daß die Reversibilität bei der Intoxikation durch Kobragift eine noch weitergehende ist als bei der Narkose durch Chloroform oder selbst durch Äther, denn Äther bewirkt schon in einer Konzentration, die nur doppelt so hoch ist, als gerade zur vollständigen Narkose ausreicht, nach etwa 2 Stunden den Tod von Kaulquappen, wenn sie die ganze Zeit in der Lösung gelassen werden, während Kaulquappen oft in Kobralösungen, die selbst dreimal so stark sind, als zur völligen Lähmung des ganzen Zentralnervensystems

ausreichen würden, viele Tage am Leben bleiben können, wobei die Zirkulation während der ganzen Zeit fortdauert und die Kaulquappen bei der schließlichen Überführung in reines Wasser nach einigen Tagen sich vollkommen erholen können. Selbst nach Verweilen in Lösungen von 1 : 100 000, d. h. in Lösungen, die ca. 15 mal stärker sind als die, die schließlich zur vollständigen Lähmung führen würden, können Kaulquappen, besonders bei niedrigeren Temperaturen, mehr als 1 Stunde verweilen, ohne die Fähigkeit verloren zu haben, sich langsam völlig zu erholen; doch ist ein solcher Zeitraum (1 bis 2 Stunden) zu kurz für das Eintreten von Gleichgewicht zwischen der Konzentration in der Außenflüssigkeit und den Konzentrationen in den verschiedenen Phasen der Kaulquappen.

In der Tat zeigt die Intoxikation mit Kobragift, besonders wenn die Versuche so ausgeführt werden wie die unsrigen, große Ähnlichkeit mit der Narkose durch indifferente Narkotica. Die Hauptunterschiede liegen darin, daß Kobragift das Respirationszentrum schon in geringeren Konzentrationen als die Großhirnrinde lähmt, und daß bei Kobragift ein viel größeres Intervall zwischen den beiden niedrigsten Konzentrationen, die einerseits gerade zur Lähmung des Zentralnervensystems, andererseits zur Lähmung des Herzens ausreicht, liegt. Selbst zwischen den lokalen Wirkungen von Chloroform oder Äther und von Kobragift sind die Unterschiede nicht so groß, wie man aus der Literatur meinen könnte, denn konzentriertere Äther- und Chloroformlösungen töten alle Gewebezellen in sehr kurzer Zeit, bei Kaulquappen z. B. oft in weniger als 1 oder 2 Minuten, und es erfolgt rasch eine Disintegration der Hautepithelien usw. wie in konzentrierten Lösungen von Kobragift.

Einiger Worte der Erörterung bedarf die Erscheinung, daß bei der Kobravergiftung die Vergiftungssymptome der Kaulquappen nach ihrer Überführung aus der Lösung ins reine Wasser nur recht langsam zurückgehen, was besonders dann auffällt, wenn die Kaulquappen noch lange Zeit nach Eintreten der vollständigen Lähmung des Zentralnervensystems in solchen Kobragiftlösungen zurückgelassen worden sind, deren Konzentration weit mehr als ausreicht, diese vollständige Lähmung hervorzurufen (z. B. in Lösungen von 1 : 400 000 bis 1 : 600 000), ehe sie in reines Wasser übergeführt werden.

Dieses hängt mit der starken „Speicherung" der wirksamen Substanz des Kobragifts durch die Gewebezellen der Kaulquappen zusammen und ist eine notwendige Folge der Diffusionsgesetze in solchen **heterogenen Systemen**, wie sie von Kaulquappen, Fischen usw. repräsentiert werden. Da für alle Konzentrationen der toxischen Substanz die Gleichgewichtsbedingungen eine viel höhere mittlere Konzentration in den Neuronen (und anderen Gewebezellen) als im Blutplasma fordern, so kann bei jedem einzelnen vollständigen Kreislauf des Blutes nur ein sehr geringer Bruchteil des in den Neuronen angehäuften Giftes entfernt werden. Wenn wir die sehr plausible Annahme machen, daß diejenige Phase A (oder diejenigen Phasen A_1, A_2, A_3 usw.) der Neurone, deren durch das Gift veränderte Zusammensetzung die Vergiftungserscheinungen bedingen, das Gift in bedeutend höheren Konzentrationen aufnehmen als die andern Phasen B, C, D usw., aus denen die Neurone aufgebaut sind, so wird die vollständige Entfernung des Gifts aus den Neuronen eine viel langsamere sein müssen, als wenn bei gleichem Gesamtgehalte der Neurone an der toxischen Substanz, das Gift in allen Phasen der Neurone ungefähr gleichmäßig verteilt und gleich stark (durch „Lösungsaffinität" oder lose chemische Bindung) festgehalten wäre, und zwar um so langsamer, je mehr die Konzentration des Giftes gerade in der Phase A im Gleichgewichtszustande die Giftkonzentration im Blutplasma übertrifft. Ob die Phase A bloß ein viel besseres Lösungsmedium für die toxische Substanz als das Blutplasma darstellt und somit der physikalische Teilungskoeffizient dieser Substanz zwischen Blutplasma und der Phase A sehr zugunsten der Phase A ausfällt, oder ob die Phase A einen Komponenten enthält, der eine im Zustande der Dissoziation befindliche chemische Verbindung mit dem Gifte eingeht oder ob beide Annahmen zugleich erfüllt werden, ändert an dieser allgemein gehaltenen Betrachtung nichts; nur würde je nach Zutreffen der einen oder der anderen Annahme in verschiedenen Konzentrationsbereichen das jeweilige Verhältnis der Konzentrationswerte in der Phase A und im Blutplasma geringere oder größere Veränderungen während des Entgiftungsprozesses aufweisen. Die Entscheidung, ob eine in Wasser begrenzt

quellbare Verbindung oder Phase bei der Aufnahme einer fremden Substanz diese Substanz bloß in Form einer Lösung oder in Form einer chemischen Verbindung, die sich im Zustande der Dissoziation befindet, enthält, ist in vielen Fällen äußerst schwer zu entscheiden,[1]) besonders wenn auch die chemische Konstitution der fremden Substanz unbekannt ist; sie hat auch keine große Bedeutung, solange die etwa postulierte Verbindung nicht in reinem Zustande isoliert werden kann.

Das sehr langsame Zurückgehen eines Lähmungszustandes bei Kaulquappen, Fischen usw. nach Überführung dieser in reines Wasser beobachtet man stets auch bei einer echten Narkose, wenn der Teilungskoeffizient des indifferenten Narkoticums zwischen Wasser und den Gehirnlipoiden sehr stark zugunsten der letzteren ausfällt, z. B. etwa im Verhältnis 1:10000 oder 1:100000, wie dies bei solchen Verbindungen wie Phenanthren der Fall ist.[2])

Es verdient besondere Betonung, daß eine Kaulquappe, die bereits einmal durch Kobragift vollständig gelähmt und auch im gelähmten Zustande längere Zeit (mehrere Tage) gehalten worden ist, sich aber nach Überführung in reines Wasser allmählich erholt hat, durch gleiche oder ungefähr gleiche Konzentration des Kobragiftes wie beim erstenmal wieder vollständig gelähmt werden kann.

Dies mag im ersten Augenblick sehr auffallend erscheinen, da wenigstens Säugetiere nach wiederholter Injektion von Kobragift allmählich eine gewisse Immunität erwerben. Es ist zwar noch nicht bewiesen, daß Amphibien Antivenine bilden können, aber doch recht wahrscheinlich, wenn auch die Bildung derselben wegen der niedrigen Körpertemperatur vermutlich langsamer erfolgen wird als bei den Säugetieren. Es muß aber zunächst hervorgehoben werden, daß Kaulquappen aus einer Lösung nicht alle Bestandteile des Kobragiftes aufnehmen, sondern wahrscheinlich nur die eigentlichen giftigen Bestandteile. Nun ist gar nicht bewiesen, daß es gerade diese giftigen Be-

[1]) Diese Schwierigkeiten werden von vielen Biologen infolge mangelnder theoretischer Bildung häufig völlig übersehen. Ein Beispiel dafür liefern unter anderen die Untersuchungen von Kyes „Über die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden".

[2]) Vgl. z. B. Overton, Studien über die Narkose. S. 125 u. 126.

standteile sind, die die Antiveninbildung auslösen. Forßmann und Bang[1]) haben bei der immunisatorischen Hämolysinbildung gefunden, daß es nicht das Toxin ist, das die Bildung von Schutzkörpern veranlaßt, sondern eine andere Substanz (das Lysogen).

Aber selbst wenn speziell bei der Bildung von Antiveninen die giftigen Bestandteile des Kobragiftes es sind, die die Antiveninbildung auslösen, wäre der Umstand, daß Kaulquappen bei einer wiederholten Vergiftung von derselben Konzentration des Kobragiftes wie beim ersten Male gelähmt werden, kein Beweis, daß die Kaulquappen keine Antivenine bilden, denn die Immunität beruht wahrscheinlich ausschließlich auf der Bindung eines größeren Teils des ins Blut gebrachten Toxins durch die Antikörper und nicht darauf, daß die Gewebezellen nach der Immunisierung erst durch eine höhere Konzentration des freien im Blute zirkulierenden Toxins affiziert werden. Solange aber die Konzentration der (freien) wirksamen Substanz des Kobragiftes in der Außenlösung konstant erhalten wird, muß, gleichgültig wieviel des Giftes im Körper der Kaulquappen von Immunkörpern gebunden wird, die Konzentration des nicht gebundenen Anteiles des Giftes im Blutplasma schließlich (im Gleichgewichtszustande) im wesentlichen den gleichen Wert erreichen und sich nur mit der Änderung der Giftkonzentration in der Außenlösung ändern.

Eben weil es wahrscheinlich ist, daß die unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien von Kaulquappen und Fischen nur die eigentlich toxisch wirkende Komponente des Kobragifts durchlassen, nicht aber die übrigen Bestandteile desselben, so würde es in der Tat von großem Interesse sein, festzustellen, ob bei dieser Art der Aufnahme der toxischen Substanz Antivenine von Kaulquappen und Fischen gebildet werden oder nicht, da, wenn ja, eine große Wahrscheinlichkeit bestehen würde, daß in diesem Falle die toxische Substanz selber die Bildung des Antivenins auslöst, während bei der Einspritzung einer Kobragiftlösung in ein Tier außer der eigentlichen toxischen Substanz alle andern Bestandteile des Sekrets der Giftdrüsen in das Versuchstier gelangen und es

[1]) Bang und Forßman, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 238, 1906.

somit unbestimmt bleibt, ob es die toxische Substanz selber oder irgend eine andre im Giftsekret vorkommende Verbindung ist, die die Antiveninproduktion auslöst.

Doch bleibt die Möglichkeit bestehen, daß ein vom Toxin verschiedenes Antigen ebenso wie das Toxin durch die Haut durchdringen könnte, analog wie Forßman[1]) die Permeabilität des Hämolysin-Antigens durch Kollodiumkapseln erwiesen hat.

II. Kapitel.

Über den Einfluß verschiedener Salze, besonders der Kalksalze, auf die Wirkungsstärke des Kobragiftes. Einfluß von Blutserum.

Während seiner Untersuchungen über die Hämolyse durch Kobragift hatte Bang[2]) gefunden, daß die Gegenwart verschiedener Salze in den das Kobragift enthaltenden Lösungen großen Einfluß auf das Eintreten oder Nicht-Eintreten der Hämolyse ausübt. Bald darauf (im Frühling 1909) konnte Overton auch bei der Vergiftung von Kaulquappen (und Fischen) durch Kobragift nachweisen, daß besonders ein Zusatz von Kalksalzen zu Kobragiftlösungen, in die Kaulquappen gebracht werden, die Giftigkeit dieser Lösungen sehr stark herabsetzen kann, und zwar um so stärker, je höher der Gehalt der Kalksalze in der Lösung steigt, sofern die Konzentration der Kalksalze nicht so hoch gewählt war, daß dieselbe auch ohne Kobragift schädliche Wirkungen auf die Kaulquappen ausgeübt haben würde.

Wir haben die Versuche in diesem Jahre (1910) wiederholt und mannigfach variiert und geben hier nach Mitteilung einiger Versuchsprotokolle die Hauptresultate der Versuche.

1. Versuche mit Kalksalzen, besonders Calciumchlorid.

Die meisten Versuche wurden mit Calciumchlorid angestellt, wobei wir Kahlbaums krystallisiertes Präparat $CaCl_2 + 6H_2O$ verwendeten. Dieses Präparat reagiert völlig neutral, während das geschmolzene wasserfreie Salz immer deutlich alkalisch reagiert, was, wie sich später zeigen wird, für die Versuche nicht gleichgültig sein kann. Die Stammlösung wurde titriert und die in den Versuchen angegebenen

---

[1]) Forßman, diese Zeitschr. 9, 330, 1908.

[2]) Bang, diese Zeitschr. 18, 441, 1909.

Konzentrationen sind auf das krystall- und wasserfreie Salz $CaCl_2$ umgerechnet.

Vorversuche mit $CaCl_2$-Lösungen ohne Kobragift zeigten, daß selbst in einer 1%igen Lösung (isotonisch mit ca. 0,7%iger NaCl-Lös.) Kaulquappen über 24 Stunden am Leben bleiben, daß aber ihre Bewegungen in dieser Lösung schon nach 12 Stunden etwas träge werden, um nach etwa 30 Stunden aufzuhören, wonach die Kaulquappen bald sterben. In 0,5%iger reiner $CaCl_2$-Lösung leben Kaulquappen wenigstens 50 Stunden und in 0,3%iger über eine Woche, ohne Abnormalitäten aufzuweisen.

Versuch mit Kaulquappen in 1:13000 Kobragift in $^1/_2$%iger $CaCl_2$-Lösung.

Um 8^{15} p. m. des 9. IV. 3 Kaulquappen von Rana fusca (12 bis 13 mm lang) kurz nach Verlust der äußeren Kiemen in genannte Lösung gesetzt (Temp. während des Versuchs 13 bis 15° C).

Um 11^{50} p. m. des 9. IV. noch ziemlich gut beweglich.

Um 11^{30} a. m. des 10. IV. 2 Kaulquappen ebensogut beweglich wie am Abend vorher, die dritte schwächliche unbeweglich und wohl tot.

Um 10^{40} p. m. des 10. IV. 2 Kaulquappen noch etwas beweglich aber sehr träge, sonst gut aussehend. Am 13. IV. tot.

In diesem Versuch ist die Konzentration des Kobragifts mehr als 100mal höher als sonst zur vollständigen Lähmung von Kaulquappen ausreicht, und ohne den $CaCl_2$-Zusatz würden sie schon nach 5 bis 10 Minuten gestorben sein, um sich bald darauf zu desintegrieren.

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift mit 0,33%igem $CaCl_2$ (A), mit 0,2%igem $CaCl_2$ (B) und mit 0,15%igem $CaCl_2$ (C).

Beginn der 3 Versuche 12^{03} a. m. des 13. IV. Je 3 Kaulquappen verwendet.

Um 3^{30} p. m. des 13. IV. (also nach mehr als 15 Stunden) alle 3 Kaulquappen in B und C und 2 in A recht lebhaft und gesund.

Um 7^{30} p. m. des 14. IV. alle Kaulquappen in B und C gesund und lebhaft, ebenso 2 in A, die ihr totes Geschwister aufgefressen haben.

Alle diese Kaulquappen blieben während mehr als 1 Woche gesund, worauf die Versuche abgebrochen wurden. Ohne $CaCl_2$-Zusatz wären die Kaulquappen nach ca. 10 Minuten völlig gelähmt gewesen und nach weniger als 1 Stunde tot (vgl. S. 248). Die zu diesen Versuchen verwendeten Kaulquappen waren erst 12 mm lang, und solche sind auch noch etwas empfindlicher gegen Kobragift als etwas ältere.

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift mit 1:1000 $CaCl_2$.

Um 8^{00} p. m. des 2. VI. 3 Kaulquappen in diese Lösung gesetzt.

Um 11^{25} p. m. alle 3 Kaulquappen völlig gesund.

Um 1^{20} p. m. des 3. VI. 2 noch lebhaft beweglich, die dritte träge.

Um 8^{25} p. m. des 3. VI. 1 Kaulquappe bewegungslos, die 2 anderen ziemlich träge (Temp. 19° C).

Am Abend des 4. VI. 2 Kaulquappen noch ziemlich gut beweglich. Versuch abgebrochen.

Alle die folgenden Versuche mit Kobragift und $CaCl_2$-Lösungen wurden angestellt, um zu ermitteln, wie weit die Giftigkeit von Kobragiftlösungen herabgesetzt wird durch derart verdünnte $CaCl_2$-Lösungen, wie sie etwa im Blutplasma vorkommen.

Versuche mit 1:100000 Kobragift in 1:3000 $CaCl_2$.

Um 8^{07} p. m. des 4. VI. zwei 18 mm lange Kaulquappen in die Lösung gesetzt (Temp. $20^1/_2$° C).

Um 11^{58} p. m. des 4. VI. beide Kaulquappen noch beweglich, aber entschieden träger als normal.

Um 2^{00} p. m. des 5. VI. beide noch etwas beweglich, wenn gereizt, aber sehr schnell ermüdend, kaum spontan beweglich, ebenso um 10^{20} p. m. des 5. VI.

Um 2^{00} p. m. des 6. VI. 1 Kaulquappe noch ziemlich gut reizbar, die andere sehr schwer. Versuch abgebrochen.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 1:5000 $CaCl_2$.

Um 6^{45} p. m. des 3. VI. 2 Kaulquappen in diese Lösung gesetzt.

Um 11^{50} p. m. des 3. VI. beide Kaulquappen beweglich, aber etwas träge.

Um 3^{35} p. m. des 4. VI. beide noch etwas beweglich, aber äußerst träge.

Um 11^{59} p. m. des 4. VI. unbeweglich, aber eben merklich reizbar.

Um 2^{10} p. m. des 5. VI. beide völlig unerregbar, aber mit gut erhaltener Zirkulation.

Am 8. VI. beide tot (Temp. während des Versuchs $19^1/_2$ bis 23° C).

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 1:10000 $CaCl_2$.

Um 8^{07} p. m. des 4. VI. 2 Kaulquappen in die Lösung gebracht. Temp. $20^1/_2$° C.

Um 11^{59} p. m. des 4. VI. beide noch beweglich, aber träge.

Um 1^{55} p. m. des 5. VI. beide völlig unerregbar, aber Zirkulation bei beiden noch lebhaft. Am Abend war die Zirkulation bei der einen schwach geworden, so daß die Schwanzcapillaren nicht mehr durchblutet waren. Am folgenden Tage beide tot.

Versuch mit 1:400000 Kobragift in 1:5000 $CaCl_2$.

Um 6^{45} p. m. des 3. VI. 3 Kaulquappen in die Lösung gesetzt (Temp. $19^1/_2$° C).

Um 11^{50} p. m. des 3. VI. alle noch gut beweglich.

Um 3^{40} p. m. und 11^{57} p. m. des 4. VI. alle noch gut beweglich, höchstens etwas träger als normal. Ebenso am 5. und 6. VI. Versuch nicht weiter protokolliert.

Versuch mit 1:400000 Kobragift in 1:10000 $CaCl_2$.

Um 6^{45} p. m. des 3. VI. 2 Kaulquappen eingesetzt (Temp. $19^1/_2{}^0$ C).

Um 11^{50} p. m. beide noch beweglich. In den folgenden Tagen blieben die Kaulquappen beweglich, aber mehr oder weniger träge.

Selbst Lösungen, die nur einen Teil $CaCl_2$ in 50000 Wasser enthalten, setzen die Toxizität von Kobralösungen sehr deutlich herab; Kaulquappen werden z. B. nicht mehr völlig gelähmt, wenn zu diesen Lösungen 1:1000000 Kobragift zugesetzt wird, und bei etwas größerem Zusatz von Kobragift treten die Vergiftungssymptome langsamer ein als bei Lösung derselben Menge Gift im gleichen Volumen reinen Wassers.

Bei sehr jungen Kaulquappen muß man etwas größere Mengen $CaCl_2$ zu Kobragiftlösungen von verschiedener Konzentration zusetzen, um sie vor der Giftwirkung zu schützen, als bei älteren Kaulquappen, wie überhaupt Kaulquappen in den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen empfindlicher sind.

Versuche mit anderen Kalksalzen zeigten, daß auch diese die Toxizität von Kobragiftlösungen stark herabsetzen, doch wurden keine genaueren quantitativen Versuche mit denselben angestellt. Nur solche Salze, die, wie äthylschwefelsaures Calcium, keine merkliche hydrolytische Dissoziation aufweisen, sind direkt vergleichbar mit $CaCl_2$, da, wie die folgenden Versuche zeigen werden, $Ca(OH)_2$-Lösungen die Toxizität von Kobragiftlösungen bedeutend stärker herabsetzen als $CaCl_2$-Lösungen von gleichem molekularem Gehalt. Calciumchloridlösungen setzen die Toxizität von Kobragiftlösungen für Fische in derselben Weise und in ungefähr gleichem Grade herab wie für Kaulquappen.

Versuche über den Einfluß sehr verdünnter $Ca(OH)_2$-Lösungen auf die Toxizität von Kobragiftlösungen.

Es ist zunächst vorauszuschicken, daß Kaulquappen sehr empfindlich sind gegen alkalische Lösungen, selbst sehr verdünnte. Sie vertragen höchstens eine Lösung von 1:5000 Na_2CO_3; ja werden auf die Dauer davon meist beschädigt wie nicht selten selbst durch eine Lösung von 1:7500; dagegen vertragen sie eine Lösung von 1:10000 Na_2CO_3 beliebig lange. Auch von Lösungen von 1:25000 $Ca(OH)_2$ werden Kaulquappen häufig etwas beschädigt, nicht mehr aber von Lösungen von 1:50000 $Ca(OH)_2$.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:25000 Kobragift und 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:50000 Kobragift.

Um 2^{33} p. m. des 13. IV. 1910 je 4 Kaulquappen gesetzt in:

A. 25 ccm einer Lösung, die 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:25000 Kobragift enthielt,

B. 25 „ „ „ „ „ „ + 1:50000 „ „

Um 3^{33} p. m. alle Kaulquappen in A und B noch gut beweglich.

Um 5^{33} p. m. alle träge, aber mehr oder weniger beweglich.

Um 6^{33} p. m. Kaulquappen in A sehr wenig beweglich, Schwanzflosse beschädigt und teilweise abgelöst. Kaulquappen in B sehr träge, aber sonst gut erhalten.

Um 7^{10} p. m. alle Kaulquappen in A tot, die in B träge, sonst gut erhalten.

Um 8^{10} p. m. Kaulquappen in B sehr träge.

Um 11^{30} p. m. kaum noch beweglich, Aussehen normal.

Um 9^{00} a. m. des 14. IV. auch die Kaulquappen in B alle tot.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:50000 $Ca(OH)_2$ + 1:50000 Kobra, 1:100000 Kobra, 1:200000 Kobra und 1:400000 Kobra.

Um 12^{55} p. m. des 30. V. 1910 wurden je 2 Kaulquappen in:

A. 40 ccm einer Lösung mit 1:50000 $Ca(OH)_2$ + 1:50000 Kobragift,
B. 40 „ „ „ „ 1:50000 „ + 1:100000 „
C. 40 „ „ „ „ 1:50000 „ + 1:200000 „
D. 40 „ „ „ „ 1:50000 „ + 1:400000 „

gesetzt.

Um 8^{00} p m. des 30. V. Kaulquappen in A und B etwas träge, die in C und D noch lebhaft.

Um 10^{00} a. m. des 31. V. Kaulquappen in A und B träge, die übrigen gesund.

Um 4^{00} p. m. des 31. V. Kaulquappen in A tot, die in B sehr träge, die in C und D noch lebhaft.

Um 8^{00} a. m. des 1. VI. Kaulquappen in B tot; die in C und D noch lebhaft.

Am 2. VI. Kaulquappen in C und D noch lebhaft. Versuch abgebrochen.

Aus diesen Versuchen sehen wir, daß $Ca(OH)_2$ die Giftigkeit von Kobragiftlösungen noch viel stärker herabsetzt als äquivalente Konzentrationen von $CaCl_2$.

Versuche mit Kobragift + Soda zeigen, daß Soda die Vergiftungserscheinungen ziemlich stark verzögert, aber die Konzentration der Grenzlösung (= schwächste Lösung, die eine vollständige Lähmung der Kaulquappen bewirkt) viel weniger herabsetzt als entsprechende Lösungen von $Ca(OH)_2$.

Versuch mit Kaulquappen in 1:5000 Soda + 1:50000 Kobragift und in derselben Konzentration von Soda + 1:100000 Kobragift.

Um 2^{10} p. m. des 15. IV. 1910 je 5 Kaulquappen in eine Lösung, die bestand aus:

A. 25 com 1:5000 Soda + 1:50000 Kobragift,
B. 25 „ 1:5000 „ + 1:100000 „

gesetzt.

Um 3^{00}, 5^{10}, 8^{20} und 10^{00} p. m. des 15. IV. Nichts Abnormales zu bemerken.

Um 1^{00} p. m. des 16. IV. Kaulquappen sowohl in A wie in B träge.

Um 5^{30} p. m. alle gestorben. (Temp. um 20° C.)

Bei Anwendung von nur 1:10000 Soda und denselben Konzentrationen von Kobragift starben die Kaulquappen viel rascher.

Versuch: Um 10^{40} a. m. des 31. V. 1910 wurde je eine Kaulquappe in:

A. 40 ccm 1:10000 Soda + 1:200000 Kobragift,
B. 40 „ 1:10000 „ + 1:400000 „

gesetzt.

Um 8^{00} p. m. des 31. V. beide Quappen noch gut beweglich.

Um 8^{00} a. m. des 1. VI. Kaulquappen in A unbeweglich, aber Zirkulation noch erhalten, ebenso um 10^{00} a. m. des 1. VI.; Kaulquappen in B noch gut beweglich.

Um 10^{30} a. m. des 2. VI. Kaulquappen in A tot mit abgelösten Epithelien. Kaulquappen in B blieben während mehrerer Tage gut beweglich.

Lösungen von 1:50000 MgO schädigen Kaulquappen nicht, aber setzen auch die giftigen Wirkungen von Kobragift sehr wenig herab, wie der folgende Versuch zeigt:

Versuch: Um 7^{30} p. m. des 15. IV. 1910 wurden je 4 Kaulquappen in:

A. 25 ccm Lösung von 1:50000 MgO + 1:50000 Kobragift,
B. 22 „ „ „ 1:50000 „ + 1:100000 „

gesetzt.

Bereits um 8^{00} p. m. des 15. IV. waren 3 Kaulquappen in A unbeweglich, die dritte sehr träge und die Kaulquappen in B alle recht träge.

Um 9^{00} p. m. des 15. IV. alle Kaulquappen in A tot, 2 in B noch etwas beweglich.

Um 9^{30} p. m. alle Kaulquappen in B ebenfalls tot.

Über den Einfluß eines Zusatzes von Kochsalz und von Magnesiumchlorid auf die Toxizität von Kobragiftlösungen.

Während Zusatz von kleinen Mengen Kalksalzen einen so außerordentlich großen Einfluß auf die Toxizität von Kobragiftlösungen auf Kaulquappen ausübt, ist der Einfluß von Magnesiumchlorid und von Natriumchlorid sehr gering, wenn auch ganz deutlich bei Anwendung von mehrpromilligen Lösungen. Auch dies gilt ebenso für Fische. Es wird genügen, je einen Versuch mit diesen beiden Salzen anzuführen, wobei vorauszuschicken ist, daß diese Salze in gleichen Konzentrationen ohne Kobragift wenigstens während einiger Tage Kaulquappen und Frösche nicht schädigen.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 0,5%igen kryst. Magnesiumchloridlösungen ($MgCl_2 + 6\,Aq$).

Um 6^{15} p. m. des 27. IV. sieben 15 mm lange Kaulquappen von R. fusca in obige Lösung gesetzt. Temp. 13 bis 14° C.

Um 8^{25} p. m. des 27. IV. alle noch ziemlich gut beweglich.

Um 12^{02} a. m. des 28. IV. alle völlig unerregbar, aber Zirkulation noch gut erhalten. Hautepithelien etwas angegriffen.

Um 8^{00} p. m. des 28. IV. keine Zirkulation mehr, Hautepithelien weniger stark angegriffen als in einer Kobragiftlösung von derselben Konzentration ohne Zusatz von Magnesiumchlorid.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 0,6%iger Kochsalzlösung.

Um 6^{17} p. m. des 27. IV. vier Kaulquappen von 15 mm Länge in obige Lösung gesetzt.

Um 12^{05} a. m. des 28. IV. (also nach fast 6 Stunden) alle noch mehr oder weniger beweglich.

Um 3^{20} p. m. des 28. IV. (ca. 21 Stunden nach Beginn des Versuchs) alle unerregbar, aber Körper sehr gut erhalten.

Um 8^{10} p. m. des 28. IV. Zirkulation noch gut erhalten, nur etwas träge. Epithelien unbeschädigt. Am 29. IV. waren die Kaulquappen noch am Leben, am 30. IV. dagegen tot.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß relativ starke Lösungen von Magnesiumchlorid die Toxizität des Kobragifts nur um ca. 50% herabsetzen und sich in dieser Hinsicht mehr als hundertmal weniger wirksam zeigen als gleichkonzentrierte Lösungen von $CaCl_2$, und daß selbst 0,6%ige NaCl-Lösungen die Toxizität nur auf zirka zwei Drittel des ursprünglichen Werts reduzieren.

Ringer-Lösung (0,6% NaCl, 0,02% KCl, 0,03% $CaCl_2$) setzt die Giftigkeit etwas stärker herab, als man nach dem Verhalten einer 0,6%igen NaCl- und einer 0,03%igen $CaCl_2$-Lösung erwarten könnte; so blieben Kaulquappen in 1:50000 Kobragift in Ringer-Lösung gelöst während 48 Stunden mehr oder weniger beweglich, wenn auch freilich träger als normal.

Versuche über das Verhalten von Kaulquappen in Blutserum mit und ohne Zusatz von Kobragift und Kobragift + $CaCl_2$.

Es mußte von Interesse sein, den Einfluß von Blutserum auf die Toxizität des Kobragifts zu erfahren. Es ist dies aber nicht ganz einfach, weil Blutserum von Säugetieren selber einen schädlichen Einfluß auf Kaulquappen ausübt. Unverdünntes Serum von Säugetieren bewirkt, ähnlich 0,9 bis 1,0%iger NaCl-Lösung,

schließlich den Tod durch Wasserentziehung; bei Kaulquappen von mehr als ca. 15 mm Länge wird diese wasserentziehende Wirkung erst nach vielen Stunden deutlich. Aber auch nach Verdünnung mit Wasser, bis der osmotische Druck nur dem einer 0,5 bis 0,6%igen Kochsalzlösung entspricht, wirkt frisches Serum allmählich tödlich auf Kaulquappen, und zwar Serum von verschiedenen Tieren in sehr ungleichem Grade, während 0,6%iges NaCl nicht schädlich wirkt. Ochsenblutserum wirkt vielmals schädlicher als Pferdeblutserum, welch letzteres nach Verdünnung mit dem halben Volumen Wasser bei 14 bis 16° C Kaulquappen erst nach ca. 30 bis 40 Stunden tötet und in den ersten 20 Stunden dieselben kaum merklich affiziert. Ochsenserum, selbst nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser, wirkt dagegen stark schädlich schon nach weniger als 3 Stunden und tödlich innerhalb 12 Stunden oder weniger. Diese Unterschiede zwischen Pferde- und Ochenserum wurden bei allen untersuchten Blutproben gefunden.

Es ist von großem Interesse, daß durch Erwärmung von Ochsenblutserum auf 56 bis 58° C während ca. 40 Minuten, also unter denselben Umständen, die zur Zerstörung der Alexine führt, die spezifisch schädliche Wirkung des Ochsenblutserums so gut wie gänzlich aufgehoben wird. Da diese Tatsache, die bei den Vorversuchen mit Sera gefunden wurde, eine größere methodische Bedeutung gewinnen kann, mögen einige Versuchsprotokolle, die diese Verhältnisse klarlegen, mitgeteilt werden.

Versuche mit Kaulquappen in frischem, mit Wasser verdünntem Ochsenblutserum.

A. Um 8^{05} p. m. des 21. IV. 1910 mehrere Kaulquappen von 13 und von ca. 16 mm Länge in ein Gemisch von 25 ccm frisches, ungeheiztes Ochsenserum (ca. 7 Stunden nach Schlachten des Tiers) + 25 ccm Wasser in einer bedeckten Krystallisierschale gesetzt (Flüssigkeitsschicht ca. 4 mm hoch.[1])

Um 11^{58} p. m. des 21. IV. (also nach ca. 4 Stunden) alle Kaulquappen noch beweglich, aber träge und geschrumpft aussehend.

[1]) Bei Versuchen mit Kaulquappen im Serum ist es stets geraten, eine Flüssigkeitsschicht von nur wenigen Millimetern Höhe anzuwenden, da sonst Sauerstoffmangel eintreten kann.

Am nächsten Morgen (22. IV.) alle Kaulquappen tot und stark geschrumpft.

B. Um 11^{00} p. m. des 21. IV. sechs jüngere und ältere Kaulquappen aus derselben Brut in 40 ccm Serum von demselben Tier + 25 ccm Wasser, nachdem das Serum vorher während 40 Minuten auf 56 bis 58° C im Wasserbade erwärmt und darauf langsam abgekühlt wurde. Am nächsten Morgen waren alle Kaulquappen gut beweglich und nicht geschrumpft. Ebenso um 8 p. m. des 22. IV. und um 7 p. m. des 23. IV.

Diese Versuche zeigen das typische Verhalten von Kaulquappen in nicht erwärmtem und vorher erwärmtem Ochsenserum. Die Schrumpfung der Kaulquappen (schon vor dem Tode) in dem schädlichen Serum ist eine regelmäßige Erscheinung und dürfte darauf beruhen, daß die Haut- und Kiemenepithelien durch das schädliche Serum so weit verändert werden, daß sie für Natriumchlorid, aber nicht für die Eiweißstoffe des Serums durchlässig werden. Unter solchen Umständen müßte eine Schrumpfung stattfinden, wenn der partiale osmotische Druck der Eiweißkörper im Serum größer ist als derjenige des Blutplasmas und der Gewebelymphe der Kaulquappen.

Ochsenblutserum, wenn nicht vorher auf ca. 56° erwärmt (die niedrigste Temperatur, welche zur Zerstörung der schädlichen Stoffe im Serum hinreicht, wurde noch nicht ermittelt), wirkt noch bei ziemlich starker Verdünnung mit Wasser und Ringer-Lösung schädlich auf Kaulquappen, aber natürlich langsamer als weniger verdünntes Serum. In einem Versuche z. B. mit 20 ccm frischem Ochsenserum + 25 ccm Wasser + 100 ccm Ringer-Lösung (mit 0,65 % NaCl, 0,02 % KCl und 0,03 % $CaCl_2$) waren alle 6 zum Versuche verwendeten Kaulquappen nach 4 Stunden noch ziemlich gut beweglich, aber bereits deutliche Anzeichen einer beginnenden Lähmung vorhanden. Nach 10 weiteren Stunden waren alle noch immer etwas beweglich, aber stark affiziert. Nach 24 Stunden vom Beginne des Versuchs waren alle fast oder ganz unerregbar und 12 Stunden später tot.

Auf die schädlichen Wirkungen von vorher nicht erhitztem Serum auf Kaulquappen hat ein Zusatz von $CaCl_2$ entweder keinen oder einen sehr geringen Einfluß, so war z. B. die Beweglichkeit von Kaulquappen in einem Gemisch von gleichen Volumina Kalbsblutserum und 0,4 % $CaCl_2$ schon nach 1 Stunde deut-

lich, nach $3^1/_2$ Stunde sehr stark beeinträchtigt. Nach 12 Stunden (vom Beginne des Versuchs) waren alle tot.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß man behufs Feststellung des Einflusses von Serum auf die Toxizität von Kobragift, sofern man Kaulquappen als Indicatoren verwenden will, entweder ein solches Serum wie Pferdeblutserum, das nur langsam eigene schädliche Wirkungen ausübt, oder aber vorher auf 56° C erwärmtes Serum verwenden sollte. Bisher wurde nur der erste Weg eingeschlagen. Es mögen die folgenden abgekürzten Versuchsprotokolle mitgeteilt werden.

Versuche mit Kaulquappen in mit Wasser etwas verdünntem Pferdeblutserum, mit und ohne Zusatz von Kobragift.

A. Um 11^{50} p. m. des 29. IV. 8 Kaulquappen (von 15 mm Länge) nach längerem Verweilen in mehrfach gewechseltem, sterilisiertem Wasser in ein Gemisch von 50 ccm Pferdeblutserum + 30 ccm dest. Wasser gesetzt (Flüssigkeitsschicht nur ca. 5 mm hoch). Temp. 11 bis 12° C.

Um 11^{30} a. m. des 30. IV. (also nach fast 12 Stunden) alle 8 Kaulquappen vollkommen gesund aussehend und gut beweglich, nicht im geringsten geschrumpft.

Um 6^{45} p. m. des 1. V. (ca. 42 Stunden nach Beginn des Versuchs) 2 Kaulquappen, noch ziemlich gut beweglich und mit gut erhaltener Zirkulation, die 6 andern unbeweglich, aber mit sehr gut erhaltenen Epithelien, keine Zirkulation in diesen Kaulquappen zu erkennen. Serum noch völlig geruchlos.

B. Um 12^{10} a. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in 1:50000 Kobragift, das in 40 ccm einer Mischung von 25 ccm Serum (von demselben Pferdeblut wie bei A) + 15 ccm dest. Wasser gelöst wurde, gesetzt.

Um 10^{50} a. m. des 30. IV. (also nach ca. $10^1/_2$ Stunden) alle Kaulquappen völlig unerregbar, aber Zirkulation noch gut erhalten und Kaulquappen sonst gut aussehend, nicht im geringsten geschrumpft.

Um 6^{47} p. m. des 1. V. alle Kaulquappen tot und Körper stark geschrumpft.

C Um 12^{13} a. m. des 30. IV. 3 Kaulquappen in 1:100000 Kobragift in eine Mischung von 25 ccm Pferdblutserum (von demselben Pferde wie bei A) + 15 ccm dest. Wasser gelöst, übergeführt.

Um 10^{55} a. m. des 30. IV. (also nach 10 Stunden 40 Minuten) Kaulquappen völlig unerregbar, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation und auch sonst sehr gut aussehend, keine Schrumpfung.

Um 6^{50} p. m. des 1. V. alle Kaulquappen tot, aber Körper besser erhalten als bei den Kaulquappen in B zu derselben Zeit.

D. und E. Um 2^{30} p. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in 1:200000 Kobragift in einem Gemisch von 25 ccm Pferdeserum + 15 ccm. dest.

Wasser gelöst und 4 andere Kaulquappen (E) in 1:400000 Kobragift gelöst, in ein Gemisch von gleichen Teilen Serum und Wasser gesetzt.

Um 10^{10} p. m. des 30. IV. alle Kaulquappen in D und E gut beweglich, ebenso um 10^{30} a. m. des 1. V.

Um 7^{00} p. m. des 1. V. einzelne Kaulquappen in D und E noch beweglich, aber träge, die andern unbeweglich, aber mit sehr gut erhaltenem Körper.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß Pferdeblutserum die Toxizität von Kobragift ungefähr in demselben Grade herabsetzt wie eine Salzlösung mit gleichem NaCl- und $CaCl_2$-Gehalt. Einen gewissen, die Toxizität herabsetzenden Einfluß müssen allerdings das im Serum suspendierte Lecithin und Cholesterin haben, wie andere Versuche zeigen, doch spielen die Salze des Serums, besonders das $CaCl_2$, die Hauptrolle.

Versuch mit Kaulquappen in 1:100000 Kobragift in einem Gemisch von 25 ccm Pferdeblutserum + 15 ccm 0,2%igen $CaCl_2$.

Um 10^{10} p. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in obiges Gemisch gesetzt.

Um 10^{30} a. m. des 1. V. (also nach mehr als 12 Stunden) alle Kaulquappen gut beweglich.

Um 7^{05} p. m. des 1. V. eine Kaulquappe noch ziemlich gut beweglich, die drei anderen unbeweglich, aber noch mit sehr gut erhaltenem Körper.

Am nächsten Tage um 3^{50} p. m. alle tot.

Der letzte Versuch ist deswegen wichtig, weil er zeigt, daß bei einem künstlich erhöhten $CaCl_2$-Gehalt des Blutplasmas die Toxizität des Kobragifts noch viel stärker als von normalem Blutplasma herabgesetzt wird. Der schließliche Tod der Kaulquappen ist jedenfalls durch Serumbestandteile, nicht durch das Kobragift verursacht worden.

Verwendet man stärkere Lösungen von Kobragift in Blutserum, so kann man auch bei Anwendung von frischem unverdünntem und nicht vorher erwärmtem Ochsenserum aus dem zeitlichen Verlaufe der Vergiftungssymptome leicht nachweisen, daß die Toxizität von Kobragift mäßig stark durch das Serum herabgesetzt wird, ganz wie durch Pferdeblutserum, aber nicht stärker. In reinem unverdünntem Ochsenblutserum werden nämlich die Bewegungen von ca. 13 mm langen Kaulquappen nach 1 Stunde noch nicht stärker beeinträchtigt und erst nach ca. 4 Stunden aufgehoben; bei Zusatz von 1:10000 Kobragift werden sie erst in $^1/_2$ Stunde völlig unerregbar,

um bald darauf zu sterben, während in 1:10000 Kobragift in reinem Wasser gelöst Kaulquappen ihre Erregbarkeit in noch bedeutend kürzerer Zeit verlieren. In derselben Weise (Studium des zeitlichen Verlaufs) kann man auch für Kobragiftkonzentrationen zwischen 1:10000 und 1:100000 in 2 Teilen Ochsenblutserum + 1 Teil Wasser sowohl die Toxizität von Kobragift im Serum, wie die Tatsache, daß die Toxizität durch Serum bedeutend herabgesetzt wird, feststellen; doch ist diese Art des Experimentierens weniger zweckmäßig als die Verwendung von Pferdeblutserum oder vorher erhitztem Ochsenblutserum zu den Versuchen.

Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Kapitels.

Die Hauptergebnisse der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche sind die, daß die Gegenwart von Kalksalzen in der Lösung die Toxizität von Kobragiftlösungen außerordentlich stark herabsetzt, und zwar nicht allein für das Zentralnervensytem, sondern auch und in ungefähr gleichem Grade für die Hautepithelien und andere Gewebezellen. Bei Gegenwart von 0,5% $CaCl_2$ in der Lösung muß man die Kobragiftkonzentration mehr als hundertmal höher nehmen, um den gleichen Vergiftungsgrad wie in einer Kobragiftlösung ohne Kalksalze zu erhalten. Calcium bildet jedenfalls mit den wirksamen Bestandteilen des Kobragifts dissoziierbare, wahrscheinlich salzartige Verbindungen, welche die lebenden Haut- und Kiemenepithelien nicht zu durchdringen vermögen. Auch Blutplasma setzt, hauptsächlich infolge seines Gehalts an Kalksalzen, teilweise aber dank seines Kochsalzgehaltes, die Toxizität des Kobragifts etwa auf ein Viertel des ursprünglichen Wertes herab, doch haben Sera von Säugetieren selber eine spezifisch schädliche Wirkung auf Kaulquappen, und zwar Sera von verschiedenen Säugetieren in sehr verschiedenem Grade. Diese schädlichen Wirkungen der Sera auf Kaulquappen können durch kurzdauernde Erhitzung auf 56° C aufgehoben werden. Zusatz von $CaCl_2$ zu Serum, das Kobragift enthält, erniedrigt die Wirksamkeit der Kobragiftbestandteile im Serum, aber nicht die spezifisch schädlichen Wirkungen des Serums selber auf Kaulquappen.

Für die praktische Behandlung eines Kobrabisses ergibt sich, daß es vorteilhaft sein muß, nach sofortiger Anlegung einer Ligatur oberhalb der Bißstelle reichliche Mengen einer 1 bis 2%igen $CaCl_2$-Lösung an verschiedenen Stellen in der Nähe des Bisses zu injizieren und die Flüssigkeit sofort wieder ausfließen zu lassen, denn die $CaCl_2$-Lösung bemächtigt sich sofort des größten Teils des noch nicht resorbierten Kobragifts, mit dem sie in Berührung kommt, ohne die Gewebe zu schädigen. Da bei erhöhtem Gehalt an Kalksalzen das im Blutplasma befindliche Kobragift weniger wirksam wird, so kann eine Resorption von einem Teil des injizierten Calciumchlorids nur nützen. Subcutane Injektionen von $CaCl_2$-Lösungen an andern Stellen der Körpers, wo die Zirkulation nicht verhindert ist, dürften (zur Vermehrung des Kalkgehalts des Blutplasmas) ebenfalls von Vorteil sein, wie denn Einspritzung von $CaCl_2$-Lösungen in den Rückensack eines Frosches, selbst längere Zeit nach vorheriger Injektion nicht allzu großer Kobragiftdosen, die Vergiftungssymptome teilweise zurückgehen machen. Wegen schneller Ausscheidung des überschüssigen Kalks aus dem Blute und der starken „Affinität" gewisser Phasen der Neurone (und anderer Gewebszellen) zu dem Kobragift darf man sich aber nicht übertriebenen Erwartungen in bezug auf die günstigen Wirkungen des $CaCl_2$ gegenüber dem bereits resorbierten Gift hingeben. Wahrscheinlich ist Antivenin hier wirksamer. Vermutlich würden sich $CaCl_2$-Lösungen auch gegenüber Viperbiß und dem Biß anderer giftiger Schlangen wirksam erweisen. (Über die Wirkung gegen Bienengift vgl. Anhang.)

III. Kapitel.

Über die teilweise Entgiftung von Kobragiftlösungen durch Antivenin unter Anwendung von Kaulquappen als Indicatoren.

Bekanntlich ist es Calmette gelungen, Antivenine gegen Kobragift und das Gift von anderen Schlangen nach ähnlichen Prinzipien wie bei der Darstellung von Antidiphtherieserum zu erhalten.

Die folgenden Versuche sind sehr geeignet, um die Wirkung der Antikörper während der Vorlesung zu demonstrieren. Sie zeigen aber auch, wie Kaulquappen dazu benutzt werden können, den Wirkungsgrad eines Antiveninserums zu messen und die

quantitativen Verhältnisse bei der Reaktion von Venin und Antivenin auf anderer Weise als bisher geschehen, zu studieren. Leider gingen uns das Antivenin und Kaulquappen von geeigneten Entwicklungsstadien aus, ehe die letztgenannten Verhältnisse in wünschenswerter Ausdehnung erforscht werden konnten. Die Untersuchung derselben soll im nächsten Frühling fortgesetzt werden.

Im Handeln kommt Antivenin sowohl in flüssiger als in fester Form in zugeschmolzenen Glasröhren vor:

Zu Versuchszwecken ist die feste Form vorzuziehen, da dieselbe auch nach Öffnung der Röhren gut haltbar ist. Wir haben ausschließlich diese Form benutzt und das eingetrocknete Antiveninserum in 0,2 bis 0,3%igen Lösungen von NaCl aufgelöst, was im Wasserbad bei 37° rasch erfolgt. Wir haben die Lösungen von Kobragift und von Antivenin miteinander gemischt, einige Zeit vor Einsetzen der Kaulquappen, und zwar wurden die gemischten Lösungen vor Beginn des eigentlichen Versuchs teils bei Zimmertemperatur, teils bei 37° gehalten, in letzterem Falle aber stets vor Einführung der Kaulquappen abgekühlt. Diese Verhältnisse sind bei den einzelnen Versuchen angegeben. Ob übrigens die Reaktion zwischen Venin und Antivenin wirklich eine meßbare Zeit erfordert, ist noch zu ermitteln. Das Nichtgelingen des ersten Versuchs, in dem Venin und Antiveninlösungen nur kurze Zeit vor Beginn des Versuchs in der Kälte gemischt wurden, führte zur angegebenen Maßregel; da aber beim ersten Versuche die Kobragiftlösung im Verhältnis zu der Antiveninlösung wirklich zu stark genommen war, beweist das Nichtgelingen desselben nichts. In allen Fällen ist die Reaktion bei Körpertemperatur eine recht rasche.

Vorversuche mit 0,1 bis 1%igem Antivenin in 0,2 oder 0,3%igen Kochsalzlösungen gelöst ohne Zusatz von Kobragift zeigten, daß diese Lösungen keine schädlichen Wirkungen auf Kaulquappen ausüben. Erst wenn dieselben nach einigen Tagen in Fäulnis geraten, können sie schädlich wirken.

Zunächst mögen drei parallele Versuche mitgeteilt werden, die bei einem Vortrage über die Wirkungsweise des Kobragiftes im hiesigen Ärzteverein (31. V. 1910) demonstriert wurden.[1])

Versuche mit Kaulquappen in 1:50000 und 1:100000 Kobragift ohne Zusatz von Antivenin und 1:50000 Kobragift mit Zusatz von $^1/_4$%igem eingetrocknetem Antiveninserum.

Um 6^{55} p. m. des 31. V. wurden je zwei 17 bis 18 mm lange Kaulquappen von Rana fusca in:

[1]) Ein Autoreferat (schwedisch) über diesen Vortrag ist in der schwedischen Zeitschrift Hygiea erschienen.

A. 1:50000 Kobragift in 20 ccm dest. Wasser,

B. 1:100000 „ „ 20 „ „ „

und um 6^{57} p. m. zwei andere Kaulquappen in

C. 1:50000 Kobragift in $^1/_4$%igem Antiveninserum (sicc.), das in 0,2%igem NaCl gelöst war. Diese Lösung wurde 3 Stunden vorher durch Mischung gleicher Volumina 1:25000 Kobragift in destilliertem Wasser und $^1/_2$%iger Lösung des festen Antiveninserums hergestellt.

Beide Kaulquappen in A waren in weniger als einer halben Stunde völlig gelähmt, die beiden in B nach ca. 1 Stunde. Die Kaulquappen in C dagegen waren am Schlusse (ca. 8^{30} p. m.) ebenso lebhaft beweglich wie vor Anfang des Versuches. Um 8 p. m. waren die Hautepithelien der Kaulquappen in A schon makroskopisch deutlich angegriffen, um 8^{30} p. m. zum Teil abgelöst.

Nach dem Vortrage wurde der Versuch noch fortgesetzt:

Um 11^{35} p. m. d. 31. V. beide Kaulquappen in C gut beweglich, höchstens etwas träger als normal. Ebenso um 11^{40} a. m. des 1. VI.; ebenso um 2^{00} p. m. des 2. VI. Noch am Abend des 4. VI. war eine Kaulquappe noch gesund, obgleich bereits Fäulnisgeruch der Lösung eingetreten war. (Temp. während dieser Versuche 17 bis 18° C.)

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift in 1%igem Antiveninserum.

Kobragift und Antivenin 4 Stunden vor Beginn des Versuchs miteinander gemischt und bei Zimmertemperatur gelassen. Temperatur während des Versuchs 18 bis $20^1/_2$° C.

Um 8^{00} p. m. des 2. VI. 2 Kaulquappen in dieses Gemisch gesetzt.

Um 11^{30} p. m. des 2. VI. beide Kaulquappen völlig gesund und lebhaft beweglich.

Um 11^{35} a. m. des 3. VI. beide Kaulquappen noch lebhaft beweglich und gesund.

Um 6^{00} p. m. des 3. VI. beide Kaulquappen noch ziemlich gut beweglich.

Um 8^{20} p. m. des 3. VI. eine Kaulquappe noch beweglich, die andere bewegungslos.

Um 11^{58} p. m. des 3. VI. ebenso.

Am folgenden Morgen beide Kaulquappen tot.

Dieser Versuch war, wegen Mangels genügender Mengen Antivenin, der einzige, der mit 1%igen Lösungen von Antivenin ausgeführt wurde, und es ist daher möglich, daß der etwas frühzeitige Tod der Kaulquappen mehr auf Zufälligkeiten beruht, als daß 1%ige Antiveninlösungen nicht völlig ausreichend sind, Kaulquappen vor so starken Lösungen von Kobragift wie 1:25000 völlig zu schützen.

Versuche mit Kaulquappen in Lösungen von Kobragift + Antivenin.

Nach Mischung der Kobragift- und der Antiveninserumlösungen wurden die gemischten Lösungen während $2^1/_2$ Stunden im Thermostaten

bei 37° gelassen (diese Zeit ist sicher unnötig lang) und nachher abgekühlt. Die angegebenen Gehalte an Kobragift und Antivenin beziehen sich auf das fertige Gemisch.

Bei jedem Versuche wurden je 20 ccm des Gemisches verwendet. Temperatur während der Versuche 13 bis 14° C.

Um 6^{30} p. m. des 5. V. 1910 wurden:

A. 4 Kq. in eine Lösung von 1:50000 Kobragift + 1:250 Antivenins. (sicc.)
B. 6 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:1000 „ „
C. 4 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:2000 „ „
D. 5 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:4000 „ „

gesetzt.

Um 7^{15} p. m. des 5. V. (also nach 55 Minuten) waren alle Kaulquappen in A, B und C noch gesund und lebhaft beweglich, in D dagegen alle mehr oder weniger stark affiziert (die Wirkung war hier schon um 6^{55} p. m. leicht erkennbar), zwei derselben waren noch ziemlich gut beweglich, zwei nur noch schlecht beweglich und eine bereits unbeweglich.

Um 7^{40} p. m. des 5. V. Verhalten aller Kaulquappen in A, B und C unverändert, Lähmung der Kaulquappen in D etwas weiter geschritten, aber noch nicht bei allen vollständig.

Um 9^{00} a. m. des 6. V. (fast 15 Stunden nach Beginn des Versuchs) alle Kaulquappen in A, B und C lebhaft beweglich, alle Kaulquappen in D dagegen völlig unerregbar, aber sonst sehr gut aussehend.

Um 7^{15} p. m. des 6. V. alle Kaulquappen in A, B und C lebhaft beweglich; in D alle unerregbar, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation.

Um 11^{15} a. m. des 7. V. Kaulquappen in A, B und C gut beweglich; in D alle tot.

Die Kaulquappen in A, B und C blieben noch während mehrerer Tage gesund.

Versuch mit Kaulquappen in 1:50000 Kobragift + 1:1000 Antiveninserum.

Um 6^{27} p. m. des 7. V. drei Kaulquappen in eine Lösung, die 1:50000 Kobragift und 1:1000 Antiveninserum (sicc.) enthielt. Die Mischung von Kobragift und Antivenin erfolgte 3 Stunden vorher und wurde bei 14° C. gelassen.

Um 11^{17} p. m. des 7. V. alle Kaulquappen noch beweglich, aber träge.

Um 12^{45} p. m. des 8. V. alle Kaulquappen unerregbar. Zirkulation aber noch gut erhalten. Protokoll nicht weiter geführt.

Antivenin 1:1000 ist also nicht genügend stark, um das Nervensystem vor der völligen Lähmung durch 1:50000 Kobragift zu schützen, setzt aber sonst die Wirkung des Kobragifts sehr stark herab.

Aus diesen und anderen Versuchen können die angenäherten Werte der Konzentrationen von Antiveninserum (sicc.) abgeleitet werden, die gerade ausreichen, Kobragiftlösungen von bekannter Konzentration so weit zu „neutralisieren", daß sie für

das Nervensystem der Kaulquappen unschädlich werden, aber nur über einen kleinen Konzentrationsbereich. So genügt

1:4000 nicht, wohl aber 1:2000 Antivenin, um 1:100000 Kobragift zu neutralisieren;

1:400, vielleicht etwas weniger Antivenin ist ausreichend, um 1:50000 Kobragift unschädlich zu machen. 1:1000 Antivenin genügt hierzu nicht.

1:100 Antivenin, vielleicht weniger, genügt, um 1:25000 Kobragift unschädlich zu machen.

Es wäre leicht, durch Ausführung einer größeren Anzahl Versuche mit Kaulquappen in ihren, zu solchen Versuchen günstigsten Entwicklungsstadien, die Werte noch viel genauer zu bestimmen und über einen viel größeren Konzentrationsbereich zu ermitteln, was womöglich im nächsten Frühling geschehen soll.

Während der wirksame Bestandteil des Kobragifts so außerordentlich leicht durch die unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien (und sicher auch in alle anderen Zellen) der Kaulquappen eindringt, dringt das Antivenin überhaupt nicht ein, wie der folgende Versuch beweist.

Versuch, um das Nichteindringen von Antivenin in Kaulquappen zu beweisen.

Um 6^{31} p. m. des 4. VI. zwei Kaulquappen von Rana fusca (ca. 18 mm lang), die seit 3^{20} p. m. des 2. VI. (also ca. 51 Stunden) in 1 %igem Antiveninserum verweilt hatten und recht gesund und lebhaft waren, nach Abspülen in reinem Wasser während 5 bis 10 Sekunden in 1:100000 Kobragift (in dest. Wasser gelöst) übergeführt, und gleichzeitig zwei andere (etwas kleinere) Kaulquappen, die nicht mit Antivenin vorbehandelt waren, in dieselbe Menge 1:100000 Kobragift gesetzt. Temp. $20^1/_2{}^0$ C.

Um 7^{05} p. m. Kaulquappen in beiden Gefäßen fast gelähmt, aber periodenweise kurzdauernde, ungeschickte Bewegungen ausführend.

Um 7^{15} p. m. die zwei etwas größeren Kaulquappen aus dem Antiveninserum fast, aber noch nicht ganz unerregbar, die zwei anderen unerregbar.

Um 7^{25} p. m. des 4. VI. alle Kaulquappen in beiden Gefäßen völlig unerregbar.

Um 11^{56} p. m. des 4. VI. alle Kaulquappen in beiden Gefäßen in histologischer Desintegration begriffen.

Die unbedeutend später eintretende vollständige Lähmung bei den Kaulquappen aus der Antiveninlösung ist jedenfalls rein zufällig.

Kaulquappen von derselben Größe werden häufig erst nach ca. 1 Stunde (vgl. Kap. I) in 1:100000 Kobragift völlig gelähmt. Im übrigen wird wahrscheinlich noch etwas Antivenin an der Außenfläche der Hautepithelien adsorbiert gewesen sein. Bei einer merklichen Aufnahme von Antivenin in die Körper der Kaulquappen müßte die Lähmung, wenn überhaupt, erst nach vielen Stunden oder Tagen eintreten.

Man kann diesen Versuch noch ergänzen dadurch, daß man Kaulquappen zuerst in 1:600000 oder weniger Kobragift völlig lähmt und, nachdem die Lähmung einige Zeit bestanden hat, einen Teil der Kaulquappen in reines Wasser, einen Teil derselben in eine Lösung von Antivenin überführt. Wenn man für die nötige Bewegung der Flüssigkeiten sorgt, tritt eine Erholung der Kaulquappen in beiden Fällen ungefähr gleich langsam ein, bei Mangel an Bewegung können die Kaulquappen in der Antiveninlösung sich etwas rascher erholen (im übrigen nicht beobachtet).

Es darf mit einer an Gewißheit grenzenden Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß, auch bei Einspritzung von Antiveninserum in ein mit Kobragift vorbehandeltes Tier, das Antivenin nicht den wirksamen Teilen des Kobragifts bis in die Neurone hinein nachjagt, daß es vielmehr bloß einen großen Teil der noch im Blutplasma und in der Gewebelymphe befindlichen Giftmoleküle bindet. Dadurch verhindert es eine weitere Aufnahme des Gifts, resp. bei bereits eingetretenem Gleichgewicht der Konzentration der Giftmoleküle in den Neuronen und in der diese umspülenden Lymphe, dieses Gleichgewicht durch Verringerung der Giftkonzentration in dieser perineuronalen Lymphe stört und dadurch einen Austritt von einigen Giftmolekülen aus den Neuronen veranlaßt. Diese wieder werden teilweise gebunden. So wird die Entgiftung herbeigeführt, wenn die Vergiftung nicht schon zu weit fortgeschritten war.

IV. Kapitel.

Über die Speicherung von Kobragift durch die roten Blutkörperchen und über die Größe dieser Speicherung unter verschiedenen Bedingungen.

Es ist schon aus früheren Untersuchungen bekannt, daß Kobragift außer seiner lähmenden Wirkung auf das Zentral-

nervensystem auch eine sogenannte lytische Wirkung auf verschiedene Zellen ausübt, eine Wirkung, die auch in dieser Abhandlung bezüglich der Hautepithelien der Kaulquappen wiederholt zur Sprache gekommen ist. Diese Wirkung tritt, wie wir gesehen haben, stets erst bei viel höheren Konzentrationen des Giftes ein als die, die zur Lähmung des Zentralnervensystems ausreicht. Bisher ist diese Eigenschaft des Kobragiftes besonders bei den roten Blutkörperchen studiert worden. Die meisten Verfasser, namentlich die aus der Ehrlichschen Schule, glaubten auch im Sekret der Giftdrüsen mindestens zwei verschiedene giftige Verbindungen unterscheiden zu müssen, die sie als Hämolysin und Neurotoxin bezeichnet haben. Einige Verfasser haben sogar die Existenz einer ganzen Reihe giftiger Substanzen im Sekret postuliert, von der jede auf eine besondere Zellart schädlich einwirken sollte. Letztere Annahme ist in allen Fällen völlig unbegründet, und es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß das Neurotoxin und Hämolysin identisch sind.

In allen Fällen beweisen die folgenden Versuche mit aller Schärfe, daß das sog. Neurotoxin von den roten Blutkörperchen in großen Mengen „gespeichert" wird und daß bei gleicher Konzentration des Neurotoxins in der umgebenden Lösung die größte Speicherung unter denselben Bedingungen erfolgt, unter den die Hämolyse am leichtesten eintritt, wobei namentlich der Einfluß der verschiedenen Salze von großer Bedeutung ist.

Um die Menge des von einem gegebenen Volumen Blutkörperchenbrei unter bekannten Bedingungen aufgenommenen Neurotoxins zu bestimmen, benutzten wir Kaulquappen als quantitative Indicatoren unter Benutzung der Daten, die im ersten Kapitel festgestellt worden sind. Daselbst fanden wir, daß bei Verwendung von ca. 40 ccm Flüssigkeit eine Konzentration von 1:1000000 Kobragift gerade ausreicht, um Kaulquappen innerhalb ca. 24 Stunden vollständig zu lähmen, und daß die Lähmung um so rascher eintritt, je mehr die Konzentration diesen Grenzwert überschreitet. Wir haben gesehen, daß die Gegenwart von 6 bis $6^1/_2$ % Rohrzucker in den Kobragiftlösungen ohne Einfluß auf den Vergiftungsverlauf ist, und daß die Gegenwart von 0,6 bis 0,65 % NaCl zwar den Grenzwert etwas, aber doch nur um ca. 50 % erhöht.

Aus den folgenden Versuchen, deren Anordnung aus den Protokollen ersichtlich ist, ergiebt sich das zunächst sehr überraschende Faktum, daß Blutkörperchen weit mehr „Neurotoxin" aus einer Lösung von Kobragift in Rohrzuckerlösung als aus einer gleich konzentrierten Giftlösung in isotonischer Kochsalzlösung aufnehmen. Die Differenzen sind außerordentlich groß, so daß von Versuchsfehlern keine Rede sein kann, um so weniger, als jeder von uns unter Anwendung etwas verschiedener Methoden zu gleichen Ergebnissen gekommen ist.

Die zwei zunächst mitzuteilenden Versuche wurden mit zwei Portionen derselben Blutprobe ausgeführt.

Versuch über die Speicherung von „Neurotoxin" durch die roten Blutkörperchen eines Kalbes. Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung suspendiert. 18. Mai 1910.

Zirka 15 ccm Blutkörperchenbrei von zentrifugiertem Kalbsblut wurden mit 200 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung gemischt und diese Suspension aufs neue zentrifugiert.

Von dem erhaltenen Brei wurden 4 ccm mit 50 ccm der Lösung von folgender Zusammensetzung gemischt: 1 ccm einer frisch bereiteten Stammlösung von Kobragift (1:1000) + 49 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung (L). Die Mischung wurde von Zeit zu Zeit gut geschüttelt und nach $^3/_4$ Stunden zentrifugiert. Während dieser Zeit nahmen die Blutkörperchen den größten Teil des Kobragiftes aus der Lösung in sich auf, wie der folgende Teil des Versuchs lehrt. Eine Hämolyse fand dabei nicht statt.

20 ccm der resultierenden farblosen Zentrifugenflüssigkeit wurden abpipettiert und mit 20 ccm Wasser verdünnt (Lösung L').

Um 11^{02} a. m. des 18. V. wurden 4 Kaulquappen von Rana fusca (ca. 16 mm lang) in diese Lösung (L') eingeführt.

Um 1^{00} p. m., um 4^{45} p. m. und um 11^{30} p. m. des 18. V. alle Kaulquappen noch normal beweglich.

Um 1^{00} p. m. und um 8^{10} p. m. des 19. V. alle Kaulquappen noch normal beweglich. Ebenso während der nächsten Tage. Temperatur während des ganzen Versuchs 17 bis 18° C.

Wenn die 4 ccm Blutkörperchenbrei kein Neurotoxin aus der ursprünglichen Lösung von Kobragift in 8%igem Rohrzucker (L) aufgenommen hätten, so müßte die Lösung L', in der sich die Kaulquappen befanden, Neurotoxin in der gleichen Konzentration wie eine Kobragiftlösung von 1:100000 enthalten haben, während in Wirklichkeit die Kaulquappen sich so verhielten wie in einer Lösung, die weniger als 1:1000000 Kobragift enthält. Die Blutkörperchen müssen also so viel Neurotoxin aus der 8%igen Rohrzuckerlösung L aufgenommen haben, daß sie (die Blutkörperchen) nach eingetretenem Gleichgewichtszustande

das Neurotoxin in einer mehr als 100 mal höheren Konzentration enthielten als die sie umgebenden Zuckerlösungen, da ja zu 50 ccm der Lösung L nur 4 ccm Blutkörperchenbrei zugesetzt worden waren.

Versuch über die Speicherung von Neurotoxin durch die roten Blutkörperchen eines Kalbes. Blutkörperchen in Kochsalzlösung suspendiert. 18. Mai 1910.

Zirka 15 ccm Blutkörperchenbrei von zentrifugiertem Kalbsblut wurden mit 200 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung gemischt und diese Suspension aufs neue zentrifugiert.

Von dem erhaltenen Brei von Blutkörperchen wurden 8 ccm zu 50 ccm einer Lösung getan, die folgendermaßen zusammengesetzt war: 1 ccm einer frisch bereiteten Stammlösung von Kobragift (1:1000) + 49 ccm 0,8%iges NaCl (Lösung L).

Wie im vorigen Versuche wurde diese Suspension von Blutkörperchen in der Lösung L $^3/_4$ Stunden unter häufigem Umschütteln sich selbst überlassen und darauf zentrifugiert. Eine Hämolyse fand auch in diesem Falle nicht statt, und wie der folgende Teil des Versuchs lehrt, war von den 8 ccm Blutkörperchen weniger Neurotoxin aufgenommen als von 4 ccm Blutkörperchen im vorigen Versuche.

20 ccm der abzentrifugierten farblosen oder fast farblosen Lösung wurden mit 20 ccm dest. Wassers verdünnt (Lösung L'). L' enthielt also neben etwas Kobragift 0,4% Natriumchlorid.

Um 11^{51} a. m. des 18. V. wurden 3 Kaulquappen in diese Lösung L' gesetzt.

Um 1^{05} p. m. (also schon nach $1^1/_4$ Stunden) alle Kaulquappen zwar noch beweglich, aber ausgeprägt träge.

Um 2^{05} p. m. alle Kaulquappen noch träger geworden.

Um 4^{40} p. m. 1 Kaulquappe ganz unbeweglich, die 2 anderen äußerst schwer beweglich.

Um 8^{20} p. m. alle Kaulquappen völlig unbeweglich, Zirkulation noch erhalten, aber ziemlich träge.

Um 11^{17} p. m. des 18. V. Kaulquappen tot.

Um 11^{20} p. m. wurde die Lösung L' mit der gleichen Menge Wasser verdünnt (Lösung L'') und drei neue Kaulquappen eingesetzt.

Um 1^{00} p. m. des 19. V. zwei dieser Kaulquappen noch etwas beweglich, aber träge. Um 8^{15} p. m. des 19. V. eine Kaulquappe noch immer etwas beweglich, eine unbeweglich, aber noch mit Zirkulation, die dritte tot.

Um 12^{10} p. m. des 18. V. wurden weiterhin 25 ccm der abzentrifugierten Lösung L (also wieder nach Aufnahme eines Teils des Kobragiftes, resp. des Neurotoxins durch die Blutkörperchen) mit 175 ccm dest. Wassers verdünnt und 4 Kaulquappen in diese Lösung, die L''' heißen mag, gesetzt.

Um 4^{15} p. m. des 18. V. Bewegungen der Kaulquappen im wesentlichen normal, vielleicht etwas träger als sonst.

Um 11^{35} p. m. des 18. V. alle Kaulquappen noch beweglich, aber etwas träge.

Um 1^{05} p. m. des 19. V. alle noch etwas beweglich.

Um 8^{20} p. m. des 19. V. drei noch beweglich, aber sehr träge, die vierte unbeweglich. Alle mit gut erhaltener Zirkulation.

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß, wenn Blutkörperchen in einer 0,8%igen Kochsalzlösung, die etwas Kobragift enthält, suspendiert werden, sie so viel Neurotoxin aus der Lösung aufnehmen, daß sie nach eingetretenem Gleichgewicht das Neurotoxin in einer ca. 6 mal höheren Konzentration enthalten als die sie umgebenden Lösungen. Dies gilt speziell für den Fall, daß die umgebende Lösung nach eingetretenem Gleichgewicht ungefähr so viel Neurotoxin enthält wie eine Lösung von 1:800000 Kobragift. Dabei ist berücksichtigt worden, daß Kaulquappen zur vollständigen Lähmung in Kochsalzlösung eine etwas höhere Kobragiftkonzentration erfordern als in einer Lösung ohne Salz.

In allen Fällen nehmen Blutkörperchen mehr als 10 mal so viel Neurotoxin aus einer Lösung von Kobragift in 8%iger Rohrzucker- als aus einer gleich konzentrierten Kobragiftlösung in einer mit der Zuckerlösung isotonischen Kochsalzlösung.

Von den zahlreichen anderen Versuchen, die in ähnlicher Weise angestellt wurden, soll nur der folgende im Auszug mitgeteilt werden.

Je 0,2 ccm Blutkörperchenbrei vom Kalbsblute, das wie vorhin mit 8%iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen worden war, wurden mit folgenden zwei Lösungen gemischt:

A. 50 ccm 1:100000 Kobragift in 8%igem Rohrzucker gelöst.

B. 50 ccm 1:200000 „ „ 8%igem „ „

Nach $^3/_4$ Stunden wurden die Lösungen A und B zentrifugiert.

Darauf wurden 20 ccm der abzentrifugierten Flüssigkeit von A mit 20 ccm dest. Wasser und 40 ccm 4%igem Rohrzucker verdünnt und zwei Kaulquappen um 11^{45} p. m. am 21. V. in diese Lösung gesetzt.

Um 8^{45} a. m. des 22. V. waren beide Kaulquappen noch etwas beweglich, aber sehr träge; um 10^{25} p. m. des 22. V. völlig unbeweglich und ohne Zirkulation.

Von der abzentrifugierten Lösung B wurden einmal wie bei A 20 ccm mit 20 ccm dest. Wasser + 40 ccm 4%iger Rohrzuckerlösung verdünnt; die resultierende Lösung bezeichnen wir mit B″. Außerdem wurden 20 ccm von B nur mit 20 ccm dest. Wasser verdünnt. Diese Lösung soll mit B′ bezeichnet werden.

Um 11^{45} p. m. des 21. V. wurden je 2 Kaulquappen in die Lösungen B′ und B″ gesetzt.

In B′ waren die Kaulquappen noch nach 9 Stunden beweglich, aber träge, nach 23 Stunden völlig gelähmt, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation. Die Konzentration des Neurotoxins in dieser Lösung B′ müßte etwas höher sein, als 1:1000000 Kobragift in 4%iger Rohrzuckerlösung

entsprechen würde. In der Lösung B″, die gerade halb soviel Gift wie die Lösung B′ enthielt, blieben die Kaulquappen tagelang normal beweglich. Die Konzentration des Neurotoxins in dieser Lösung müßte also geringer gewesen sein, als einer Kobragiftlösung von 1:1000000 entspräche.

Die Verteilung des Neurotoxins zwischen gleichen Volumina Blutkörperchen und 8%iger Rohrzuckerlösung würde sich aus dem Versuche zu ca. 200:1 ergeben.

Der folgende Versuch wurde nach einer nur wenig modifizierten Methode ausgeführt.

Versuch: 50 ccm Kalbsblut wurden mit 150 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung versetzt und darauf scharf zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde darauf abgegossen und die Blutkörperchen mit 8%iger Rohrzuckerlösung bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt. Von dieser Blutaufschwemmung wurden 4 Proben à 2 ccm abpipettiert und jede Probe mit 38 ccm 6,5%iger Rohrzuckerlösung verdünnt. Zu den so erhaltenen Blutkörperchensuspensionen wurde in absteigender Menge so viel einer 0,1%igen Kobragiftlösung zugesetzt, daß die Suspensionen folgende Giftquantitäten enthielten:

a) 1:25000, b) 1:50000, c) 1:100000 und d) 1:200000.

Nach 1 Stunde wurde scharf zentrifugiert, wonach man 38 bis 39 ccm fast farblose Zuckerlösung von jeder Probe abpipettieren konnte.

Um 6^{45} p. m. des 18. IV. 1910 wurde in jede dieser abpipettierten Proben je eine Kaulquappe eingesetzt.

Um 8^{50} p. m. die Kaulquappen in a) unbeweglich, die Kaulquappen in den drei andern Lösungen noch beweglich. Zirkulation bei der Kaulquappe in a) noch erhalten, ebenso um 11^{00} p. m. aber schon träge.

Um 10^{00} a. m. des 19. IV. Kaulquappen in a) und b) unbeweglich, in c) und d) dagegen noch gut beweglich, ebenso nachmittag.

Am 20. IV. die Kaulquappe in c) unbeweglich, aber mit erhaltener Zirkulation, die Kaulquappe in d) noch lebhaft beweglich.

Auch aus diesem Versuche würde sich eine Teilung des Neurotoxins zwischen Blutkörperchen und Lösung in einem Verhältnis von mehr als 200:1 zugunsten der Blutkörperchen ergeben.

Wenn man die abzentrifugierten Blutkörperchen in der Probe a) mit ca. 40 ccm reiner, 6,5%iger Zuckerlösung versetzt, so geben dieselben so viel Neurotoxin wieder ab, daß Kaulquappen durch die Lösung völlig gelähmt werden. Das Neurotoxin ist also von den Blutkörperchen nicht zersetzt worden, und die Aufnahme desselben durch die Blutkörperchen muß auf einem reversiblen Prozeß beruhen.

Wir haben schon gesehen, daß, wenn Blutkörperchen in einer Kochsalzlösung suspendiert werden, die Kobragift in einer bestimmten Konzentration enthält, sie viel weniger Gift aufnehmen, als wenn sie in einer isotonischen Rohrzuckerlösung,

die Kobragift in derselben Konzentration enthält, suspendiert werden. Dem entspricht die Erfahrung, daß, wenn man gleiche Volumina Blutkörperchen, die sich vorher in derselben mit Kobragift versetzten 8%igen Rohrzuckerlösung mit Gift beladen haben, einerseits mit einer 8%igen Rohrzuckerlösung, andererseits mit einer gleichen Menge isotonischer Kochsalzlösung behandelt, sie vielmehr Gift an die Kochsalzlösung als an die Zuckerlösung abgeben, was wieder durch Anwendung von Kaulquappen als quantitative Indicatoren gezeigt werden kann.

Daß Kaulquappen nur eine wenig höhere Konzentration von Kobragift erfordern, um völlig gelähmt zu werden, wenn sich das Kobragift in einer Kochsalzlösung anstatt in einer isotonischen Rohrzuckerlösung oder in reinem Wasser gelöst findet, während Blutkörperchen aus einer mit Kobragift versetzten Kochsalzlösung viel weniger Neurotoxin aufnehmen als aus gleich konzentriertem Kobragift in Zuckerlösung, ist an und für sich eine merkwürdige Tatsache, spricht aber keineswegs gegen die Identität von Neurotoxin und Hämolysin in Kobragift, da Bang[1]) schon früher gezeigt hat, daß das Kobragifthämolysin von Blutkörperchen, die in Zuckerlösungen suspendiert sind, viel reichlicher aufgenommen wird als durch solche, die in Lösungen von Natriumchlorid oder andern Salzen aufgeschwemmt sind. In derselben Arbeit hat Bang versucht, eine Erklärung dieser Tatsache zu geben.

Wenn Blutkörperchen sich in einer mit Kobragift versetzten Rohrzuckerlösung mit Gift beladen haben, so geben sie einen bedeutend größeren Teil des Giftes wieder ab, wenn sie durch Wasser hämolysiert werden, als wenn sie mit einem gleichen Volumen Zuckerlösung versetzt werden. Dies macht es wahrscheinlich, daß das Kobragift in den Blutkörperchen nicht bloß von den Lipoiden der Blutkörperchen gespeichert werden, sondern auch von in Wasser löslichen Bestandteilen der Blutkörperchen, z. B. deren Alkalisalzen gebunden werden, wie dies von Bang schon früher vermutet worden ist. Da Blutkörperchen viel weniger Kobragift aus Kochsalzlösungen als aus Rohrzuckerlösungen bei gleichem Kobragiftgehalt der beiden Lösungen aufnehmen, so können die ersteren bei der Hämolyse durch viel Wasser natürlich auch nur weniger Gift wieder abgeben.

[1]) Bang, diese Zeitschr. 18, 441, 1909.

Der folgende Versuch gibt einen Überblick über diese Verhältnisse.

Versuch: Kalbsblut wurde mit 0,8%iger Kochsalzlösung resp. mit 8%iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen, zentrifugiert und die Blutkörperchen bzw. mit Kochsalz und Rohrzucker von den genannten Konzentrationen bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt.

2 ccm der beiden Aufschwemmungen wurden bzw. mit 40 ccm Zuckerlösung und mit 40 ccm NaCl-Lösung gemischt und zu den beiden Suspensionen so viel Kobragift zugesetzt, als einer mittleren Konzentration von 1:50000 entpricht.

Nach $1^1/_2$ Stunden wurden die beiden Proben zentrifugiert und darauf sowohl die Blutkörperchen der Zuckerlösung wie die der Kochsalzlösung durch je 40 ccm Wasser hämolysiert. Wir bezeichnen die erste hämolysierte Lösung mit A, die zweite mit B.

Um 1^{30} p. m. des 21. V. 1910 wurde je eine Kaulquappe in die Lösungen A und B eingesetzt.

Um 5^{30} p. m. des 21. V. die Kaulquappe in A bereits tot, die in B noch etwas beweglich; später starb auch diese.

Um 5^{32} p. m. des 21. V. wurden 20 ccm von A mit 20 ccm Wasser (= Lösung A_1) und 10 ccm A mit 30 ccm Wasser (= Lösung A_2) verdünnt. In die Lösungen A_1 und A_2 wurde je eine Kaulquappe gesetzt.

Um 6^{10} p. m. des 21. V. wurden auch 20 ccm der Lösung B mit der gleichen Menge Wasser verdünnt (= Lösung B_1) und eine Kaulquappe eingesetzt. Diese letzte Kaulquappe (in B_1) blieb tagelang beweglich.

Um 6^{10} p. m. des 21. V. die Kaulquappen in A_1 und A_2 noch gut beweglich, aber beide am folgenden Morgen schon tot.

Um 9^{45} a. m. des 22. V. wurden 5 ccm der Lösung A mit 35 ccm Wasser (= Lösung A_3) und $2^1/_2$ ccm der Lösung A mit $37^1/_2$ ccm Wasser verdünnt (= Lösung A_4) und in diese beiden Lösungen je eine Kaulquappe gesetzt. Die Kaulquappe in A_4 überlebte, die in A_3 starb innnerhalb 24 Stdn.

Dieser Versuch wurde noch dadurch ergänzt, daß je 20 ccm der Rohrzuckerlösung, aus der die Blutkörperchen einen großen Teil des Giftes aufgenommen hatten, nach dem Zentrifugieren abpipettiert wurden und mit 20 ccm Wasser verdünnt (= Lösung C) und ebenso 20 ccm der Kochsalzlösung, aus der die Blutkörperchen Gift aufgenommen hatten, mit 20 ccm Wasser versetzt (= Lösung D).

Um 1^{30} p. m. des 21. V. 1901 wurden je zwei Kaulquappen in diese Lösungen C und D gesetzt.

Die Kaulquappen in C überlebten mehrere Tage, die in D waren schon nach 5 Stunden beide tot.

In Kapitel II wurde gezeigt, daß Anwesenheit von Magnesiumchlorid in einer Kobragiftlösung, in der sich Kaul-

quappen befinden, nur einen geringen Einfluß auf den Verlauf der Vergiftung hat. Es wird dadurch nur wie bei Anwesenheit von NaCl in der Lösung die Minimalkonzentration des Kobragiftes, die zur vollständigen Narkose der Kaulquappen erforderlich ist, etwas erhöht. Bang hatte aber früher gefunden, daß Blutkörperchen aus einer mit Kobragift versetzten Magnesiumchloridlösung viel weniger Kobra-Hämolysin aufnehmen als aus einer isotonischen mit Kobragift versetzten Rohrzuckerlösung. Es müßte darum von Interesse sein, die Aufnahme von Neurotoxin aus magnesiumchloridhaltigen Lösungen durch Blutkörperchen zu untersuchen. Der folgende Versuch gibt Aufschluß hierüber.

Versuch: 50 ccm Kalbsblut wurden mit 8%iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen, zentrifugiert und die Blutkörperchen mit einer frischen Zuckerlösung bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt. Von dieser Blutkörperchen-Suspension wurden 2 Proben zu je 2 ccm genommen und jede Probe mit 38 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung versetzt. Zu der einen Probe, die als B bezeichnet sei, kamen außerdem 0,5% einer 4%igen kryst. Magnesiumchloridlösung ($MgCl_2 + 6\,Aq$). Der Gehalt dieser Lösung B an Magnesiumchlorid ($MgCl_2 + 6\,Aq$) betrug also 0,5‰.

Die andere Probe, die wir mit A bezeichnen, enthielt kein Salz.

Zu den Blutkörperchensuspensionen A und B wurde so viel einer 1‰igen Kobragiftlösung zugesetzt, daß die mittlere Konzentration des Kobragiftes in beiden 1:50000 betrug.

Nach $^1/_2$ Stunde Stehen bei 19° C wurden A und B zentrifugiert, worauf je 20 ccm des Abgusses von A und B mit 20 ccm Wasser verdünnt wurden. Die so verdünnten Lösungen bezeichnen wir mit A_1 und B_1.

Um 8^{15} p. m. des 17. V. wurde je eine Kaulquappe in jede dieser Lösungen A_1 und B_1 gesetzt.

Die Kaulquappe in A_1 blieb über 2 Tage beweglich. Am Morgen des 18. war die Kaulquappe in B_1 bereits tot.

Um 9^{30} a. m. des 18. wurden 10 ccm des Abgusses von B mit 30 ccm Wasser verdünnt (Lösung B_2) und eine Kaulquappe in diese Lösung B_2 gesetzt.

Um 5^{30} p. m. des 18. war die Kaulquappe in B_2 sehr träge und am nächsten Morgen tot.

Daß Zusatz von mäßigen Mengen Calciumchlorid (0,1 bis 0,2%) zu Kobragiftlösungen die Giftigkeit dieser Lösungen außerordentlich stark herabsetzt, sowohl bezüglich deren Einwirken auf das Zentralnervensystem wie auf die Hautepithelien usw., haben wir im zweiten Kapitel gezeigt. Bang fand dasselbe für die hämolytische Wirkung des Kobragiftes.

Alle diese Ergebnisse sprechen sehr zugunsten der Annahme, daß das Hämolysin des Kobragiftes sich nicht von

dem Neurotoxin unterscheidet, wenn auch zugegeben werden muß, daß der strenge Beweis dafür in quantitativer Hinsicht noch nicht erbracht ist.

Es wurden zum Schlusse einige Versuche ausgeführt, um einen etwaigen Einfluß von Suspensionen von Lecithin, Cholesterin und Olivenöl in den Lösungen, in denen Kaulquappen sich befanden, auf den Verlauf der Kobragiftintoxikation zu untersuchen. Die Versuche hatten zwar ein positives Ergebnis, indem alle drei Stoffe die Giftwirkung abschwächen, doch ist diese Wirkung keineswegs stark, am stärksten noch für Olivenöl. Es muß indessen bemerkt werden, daß schon recht geringe Zusätze Lecithin in Form der gewöhnlichen Handelsprodukte an und für sich schädlich auf Kaulquappen wirken, und zwar verschiedene Handelsprodukte in ungleichem Grade. So bewirkte ein Zusatz von 1:2000 sog. Agfa-Lecithin (der Zusatz geschah in Form einer Lösung von Lecithin in Methylalkohol zum Wasser, wobei die Menge Methylalkohol weit unter dem schädlichen Werte blieb) schon nach ca. 5 Stunden den Tod. Zusätze von 1:4000 und 1:8000 wurden bedeutend länger ertragen, führten aber auch innerhalb 36 bis 48 Stunden zum Tode der Kaulquappen. Beim Studium des Einflusses von Lecithin auf die Wirkung von Kobragift müssen also entweder äußerst geringe Lecithinmengen genommen werden oder es muß die Schnelligkeit, mit der die Lähmung eintritt, als Maßstab der Wirkung dienen. Es seien nun einige wenige Versuche über die abschwächende Wirkung der drei genannten Stoffe hier mitgeteilt.

Versuch mit Lecithin.

Um 6^{47} p. m. des 24. IV. 1910 wurden je 2 Kaulquappen in folgende drei Lösungen gesetzt:

a) 40 ccm einer Lösung, die 1:8000 Lecithin (Mercks Präparat) und 1:50000 Kobragift enthielt.

b) 40 ccm 1:8000 Lecithin + 1:100000 Kobragift.

c) 40 ccm 1:8000 Lecithin + 1:200000 Kobragift.

Um 8^{00} p. m. Kaulquappen in a), b) und c) alle noch beweglich; die in a) wären es sicher nicht mehr gewesen nach dieser Zeit ohne Zusatz von Lecithin, die in b) wahrscheinlich nicht mehr.

Um 11^{15} p. m. des 24. Kaulquappen in a) tot, Epithelien angegriffen, die Kaulquappen in b) waren noch beweglich, aber träge und selbst die Kaulquappen in c) weniger beweglich als normal. Das Verhalten der Kaulquappen war ungefähr dasselbe wie in Lösungen von

1:300000 und 1:500000 Kobragift ohne Zusatz von Lecithin nach gleicher Versuchsdauer. Am nächsten Morgen waren indessen auch die Kaulquappen in b) und c) bereits tot.

Sehr ähnlich verliefen die übrigen Versuche über den Einfluß von Lecithinzusatz zu den Lösungen. Immer war der Einfluß deutlich abschwächend, besonders in den ersten Stunden, aber nicht eigentlich stark zu nennen.

Aufschwemmungen von 1:10000 Cholesterin in den Kobragiftlösungen hatten ebenfalls nur eine etwas abschwächende Wirkung auf die Vergiftungserscheinungen. Es ist indessen zu bemerken, daß Kaulquappen das Cholesterin durch den Magen aufnehmen, wie an der Entleerung von weißen Exkrementen, die fast gänzlich aus Cholesterin bestehen, leicht zu erkennen ist.

Wenn das Cholesterin vor Einsetzen der Kaulquappen in die Lösung entfernt wird, so ist die abschwächende Wirkung eine deutlichere.

Versuche mit Olivenöl.

Versuch 1. 100 ccm Olivenöl wurden während $^1/_2$ Stunde mit festem Bariumoxyd im Wasserbad gekocht und von den gebildeten Bariumseifen abfiltriert.

Darauf wurden je 25 ccm 1:250000 Kobragift a) mit 10 ccm, b) mit 5 ccm, c) mit 2,5 ccm des gereinigten Olivenöls versetzt und die 3 Mischungen darauf während $^1/_2$ Stunde durch eine Schüttelmaschine geschüttelt. In a) und b) war das Öl nach 1 Stunde scharf von der Wasserlösung getrennt, in c) dagegen war das Öl emulsioniert. Alle Proben wurden filtriert. Filtrate von a) und b) ganz klar, Filtrat von c) schwach opalescierend.

Zu 20 ccm jeder der 3 Filtrate wurden 20 ccm Wasser zugesetzt so daß die Lösungen 1:500000 Kobragift enthalten müßten, wenn ein Teil des Giftes nicht in das Öl übergegangen wäre. Darauf wurden je 2 Kaulquappen in die 3 Lösungen gesetzt. Noch nach 2 Tagen waren alle Kaulquappen lebhaft beweglich, so daß in allen 3 Proben das Öl mehr als die Hälfte der wirksamen Bestandteile des Kobragiftes (oder wenigstens des Neurotoxins) den wässerigen Lösungen entrissen haben mußte.

Versuch 2. 100 ccm Olivenöl wurden mit ca. 25 ccm 20%igem NaOH versetzt, mit Wasser verdünnt, gut durchschüttelt und mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde so lange mit wiederholt gewechseltem Wasser ausgeschüttelt, bis das Waschwasser nicht mehr mit Phenolphthalein reagierte und darauf der Äther auf dem Wasserbade verjagt.

Sodann wurden je 40 ccm einer Lösung von 1:50000 Kobragift mit a) 1 ccm, b) 0,5 ccm und c) mit 0,2 ccm dieses neutralen Öles versetzt und $^1/_2$ Stunde lang (in der Maschine) geschüttelt, worauf in jede Lösung ohne vorhergehende Filtration 1 Kaulquappe zugesetzt wurde.

In Lösungen b) und c) starben die Kaulquappen nach $1^1/_2$ Stunden. In Lösung a) überlebten sie mehr als 24 Stunden. Drei andere Lösungen

a^1, b^1, c^1 wurden auf dieselbe Weise bereitet, aber vor der Einführung der Kaulquappen filtriert.

Um 9^{30} a. m. des 12. V. 1910 wurde je 1 Kaulquappe in die filtrierten Lösungen gesetzt.

Um 9^{30} a. m. des 13. V. (also nach 24 Stunden) waren die Kaulquappen in den Lösungen a^1 und b^1 noch recht lebhaft, die in c^1 etwas träge.

Um 12^{30} p. m. des 13. V.: Kaulquappe in c^1 sehr träge, die in a^1 und b^1 lebhaft.

Um 6^{00} p. m. des 13. V.: Kaulquappe in c^1 fast gänzlich unbeweglich.

Um 9^{30} a. m. des 14. V.: Kaulquappe in c^1 tot, die in a^1 und b^1 noch lebhaft.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß das Olivenöl den Lösungen ganz bedeutende Mengen Kobragift entzogen hatte. Immerhin ist die abschwächende Wirkung des Öls auf die Intoxikation durch Kobragift viel geringer als die durch Zusatz von Calciumsalzen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß bei den verschiedenen Operationen etwas Kobragift zerstört worden ist.

Anhang.

Verhalten von Kaulquappen in Lösungen von Tetanusgift, Diphtheriegift und Bienengift.

Nach den Erfahrungen mit Kobragift lag der Gedanke nahe, Kaulquappen auch beim Studium der Bakterientoxine zu verwenden. Unsere bisherigen Versuche mit Tetanus- und Diphtheriegiftlösungen führten indessen zu keinem Erfolge, da Kaulquappen sich äußerst unempfindlich gegen Lösungen dieser Gifte erwiesen.

Bekanntlich pflegt man die Stammlösungen dieser Gifte mit Toluol zu versetzen, um sie haltbarer zu machen. Verwendet man daher eine unverdünnte Stammlösung zu Versuchen mit Kaulquappen, so werden diese sehr rasch durch das gelöste und in Suspension befindliche Toluol getötet. Werden die Stammlösungen mit ca. der 10fachen Menge Wasser verdünnt, so tritt sehr rasch Narkose der Kaulquappen ein; diese Narkose wird nach Überführung der Kaulquappen in reines Wasser schon nach wenigen Minuten wieder aufgehoben, sofern die Narkose nicht zu lange gedauert hat. — Wenn aber die Stammgiftlösungen etwas weiter, z. B. mit der 30 oder 40fachen Wassermenge verdünnt werden, so zeigen sich die erhaltenen Lösungen (50 bis 100 ccm Lösung wurden zu den Versuchen verwendet) völlig ohne Wirkung auf Kaulquappen selbst nach 24 bis 36 Stunden, obgleich die Stammlösung der Diphtheriegifte[1]) so stark war, daß 0,01 ccm für 100 g Meerschweinchen tödlich war.

[1]) Die Diphtheriegiftlösung verdanken wir der Güte von Herrn Dr. Madsen.

Es ist allerdings zu bemerken, daß die Versuche bei gewöhnlicher Zimmertemperatur ausgeführt wurden, und es ist nicht unmöglich, daß man bei höherer Temperatur oder mit anderen Bakteriengiften günstigere Erfolge haben wird. Die Zeit reichte nicht aus, die Versuchsbedingungen in wünschenswerter Weise zu variieren.

Mehr Erfolg hatten unsere Versuche mit Bienengift insofern, als sich hier die günstige Wirkung eines Zusatzes von Calciumchlorid zu den Giftlösungen sehr leicht erweisen ließ, obgleich die Wirkung viel geringer als bei Kobragift ist.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß die Giftblasen von ca. 200 (durch Ätherdämpfe getöteten) Bienen mit 8 ccm Wasser zerrieben wurden, die Lösung filtriert und diese Stammlösung sofort zur Bereitung der eigentlichen Versuchslösungen verwendet wurde.

Vorversuche zeigten, daß, wenn Kaulquappen in 0,3 ccm einer solchen Stammlösung + 10 oder 20 ccm Wasser gesetzt wurden, sie in weniger als 1 Stunde starben, wobei in erster Zeit starke periphere Reizung, bald aber zentrale Störungen eintraten. Die Zirkulation erhält sich noch zu einer Zeit, in der die Hautepithelien bereits stark angegriffen sind.

In Gemischen von 0,3 ccm Stammgiftlösung + 40 ccm Wasser waren die peripheren Wirkungen zunächst ziemlich gering, aber die Kaulquappen wurden nach 1 Stunde sehr träge, aber doch noch etwas beweglich. Nach 3 Stunden waren sie schon tot, die Hautepithelien nur wenig angegriffen.

In Gemischen von 0,25 ccm Stammlösung + 100 ccm Wasser lebten Kaulquappen bedeutend länger; nach 12 Stunden waren sie indessen schon sehr träge und starben nach 20 bis 40 Stunden.

Lösungen von 0,25 ccm Stammgiftlösung auf 200 ccm Wasser zeigten sich als im wesentlichen indifferent für Kaulquappen.

In Gemischen von 0,25 ccm Stammgiftlösung + 20 ccm 0,2%iger $CaCl_2$-Lösungen dagegen zeigten Kaulquappen nicht die geringsten Störungen selbst nach 5 bis 6 Tagen; sie starben indessen in Gemischen von 0,25 ccm Stammlösung Bienengift + 10 ccm 0,2%iger $CaCl_2$-Lösungen, aber erst nach viel längerer Zeit als in parallelen Versuchen ohne Zusatz von $CaCl_2$.

Wiederholte, streng parallele Versuche zeigten, daß ein Zusatz von 0,2%igem $CaCl_2$ zu Bienengiftlösungen die Toxizität dieser Lösungen mindestens um 4 bis 6mal herabsetzt. Selbstverständlich wurde auch bei diesen Versuchen nur krystallisiertes Calciumchlorid ($CaCl_2 + 6\,Aq$) zur Bereitung der Lösungen verwendet.

Wegen der geringen Haltbarkeit von Bienengiftlösungen und ihrer weniger charakteristischen resorptiven Wirkungen haben wir indessen die Versuche nicht weiter fortgesetzt.

Zusammenfassung einiger der wichtigeren Resultate.

1. Werden junge Kaulquappen in Lösungen von Kobragift in reinem Wasser gesetzt, so wird das ganze Zentralnerven-

system schon bei Konzentrationen von 1:1000000 innerhalb ca. 24 Stunden vollständig gelähmt; bei sehr reichlichen Mengen Lösung sogar nach längerer Zeit bei 1:1500000.

2. Selbst nach Verweilen in Lösungen von 1:400000 oder 1:500000 Kobragift während mehrerer Tage bleibt die Zirkulation besonders bei nicht zu hoher Temperatur erhalten, und nach Übertragung in reines Wasser können die Kaulquappen sich allmählich, aber recht langsam erholen. Die Vergiftung ist in solchen Lösungen eine reversible.

3. In Lösungen von 1:25000 tritt vollständige Narkose nach ca. 10 bis 15 Minuten ein, bei 1:50000 in ca. 20 bis 25 Minuten, in 1:100000 nach ca. 1 Stunde, in 1:300000 nach ca. 3 bis 4 Stunden.

4. Bei Konzentrationen von mehr als 1:400000 ist die Vergiftung nach Verlauf von einigen Stunden nicht mehr reversibel, indem die Hautepithelien allmählich angegriffen werden, bei Konzentrationen von mehr als 1:100000 sogar recht rasch.

5. Kaulquappen, die bereits ein oder mehreremal durch Kobragift gelähmt gewesen sind, aber nach Überführung in reines Wasser sich erholt haben, wurden bei ca. derselben Konzentration des Kobragiftes wie bei der ersten Vergiftung gelähmt.

6. Das Gift dringt mindestens ebenso schnell, wahrscheinlich noch schneller durch die lebendige, unbeschädigte Haut- und Kiemenepithelien als Chloralhydrat, dagegen etwas langsamer als die meisten anderen Narkotica. Das Eindringen muß sehr viel rascher sein als das von Glycerin und Harnstoff.

7. Die Gegenwart von Calciumsalzen in den Kobragiftlösungen setzt die Toxizität der Lösungen stark herab, um so stärker, je konzentrierter die Calciumlösungen sind. Allzu konzentrierte Lösungen von Calciumsalzen wirken indessen selber schädlich auf Kaulquappen, so z. B. Lösungen von $CaCl_2$ von mehr als $^1/_2$ %. Bei Gegenwart von $^1/_2$ % $CaCl_2$ in einer Kobragiftlösung muß das Kobragift, um die gleichen Wirkungen auszuüben, ca. 100mal konzentrierter sein als in einer Lösung ohne $CaCl_2$.

8. Sehr verdünnte Lösungen von $Ca(OH)_2$, z. B. solche von 1:50000 wirken bedeutend stärker als äquivalente Lösungen von $CaCl_2$.

9. Magnesium- und Natriumsalze schwächen ebenfalls die Toxizität in Kobragiftlösungen bis zu einem gewissen Grade, aber außerordentlich viel weniger als Calciumsalze.

10. Durch Anwesenheit von Antivenin in Kobragiftlösungen kann die Toxizität der letzteren sehr stark herabgesetzt werden.

11. Das sog. „Neurotoxin" wird von den roten Blutkörperchen aus isotonischen Rohrzuckerlösungen außerordentlich stark gespeichert, bedeutend schwächer aus isotonischen Kochsalzlösungen. Das Neurotoxin ist wahrscheinlich identisch mit dem Hämolysin des Kobragiftes.

12. Die mit Neurotoxin beladenen roten Blutkörperchen können dieses wieder abgeben, wenn die Konzentration des Neurotoxins in die die Blutkörperchen umgebende Lösung abnimmt.

13. Neurotoxin wird mehr oder weniger von Lecithin, Cholesterin und besonders Olivenöl gespeichert. Auch dieser Vorgang ist reversibel.

14. Die Toxizität von Bienengiftlösungen für Kaulquappen wird durch Zusatz von 0,2% $CaCl_2$ ziemlich stark (4 bis 6mal) herabgesetzt, aber doch viel weniger als die von Kobragift.

Das Verhalten der Schardingerschen Reaktion gegenüber Colostralmilch von Kühen.

Von

Richard Reinhardt und Ernst Seibold.

(Aus dem Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztl. Hochschule in Stuttgart.)

(Eingegangen am 29. Januar 1911.)

Im Jahre 1902 hat Schardinger[1]) seine Beobachtung veröffentlicht, wonach frische, ungekochte Milch, mit einer entsprechenden Menge eines Formalin-Methylenblaugemisches versetzt, diese Lösung bei einer optimalen Temperatur von 70° innerhalb 10 Minuten entfärbe, während die Reaktion bei Verwendung von über 70° erhitzter oder mit Wasser vermischter Milch ausbleibe; diese Erscheinung lasse sich zum Nachweis einer stattgehabten Erhitzung der Milch oder einer Verfälschung derselben mit Wasser verwenden.

Die Befunde Schardingers wurden in den folgenden Jahren von verschiedenen Autoren bestätigt, so von Utz[2]), Smidt[3]), Seligman[4]), Brand[5]), Sommerfeld[6]), Raudnitz[7]), Trommsdorff[8]) u. a. Es wurde jedoch von einzelnen die weitere Beobachtung gemacht, daß die Reaktion unter Umständen auch in gekochter oder pasteurisierter Milch

---

[1]) Zeitschr f. Nahrungs- u. Genußmittel 1902, 1113.
[2]) Milchzeitung 1903, 32.
[3]) Hygienische Rundschau 1904, 1137.
[4]) Zeitschr. f. Hygiene 52, 161 und 58, 1.
[5]) Münch. med. Wochenschr. 1907, 821.
[6]) Hygien. Zentralbl. 1908, 1.
[7]) Ergebnisse der Physiologie 2, 1 und Sammelreferate.
[8]) Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 49, 291.

wieder auftreten kann, so daß das Schardinger-Reagens kein absolut sicheres Mittel zur Unterscheidung roher von gekochter Milch darstellt. Und andererseits wurde gefunden, daß die Entfärbung auch einmal in ungekochter Milch ausbleiben kann. So hat Brand (l. c.) mit Milch von 2 Kühen, die eine etwas wässerige Milch lieferten, keine Entfärbung der Mischung erzielen können. Trommsdorff (l. c.) fand ebenfalls einmal, daß keimfrei gewonnene Milch die Reaktion nicht gab.

Neuestens haben zwei nahezu gleichzeitig, aber unabhängig voneinander erschienene Veröffentlichungen, die sich mit der Schardinger-Reaktion befassen, die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt. In den beiden Arbeiten, die Koning[1]) und Schern[2]) zu Verfassern haben, werden die Beobachtungen Schardingers im großen ganzen — allerdings mit gewissen Einschränkungen — bestätigt; die beiden eben genannnten Autoren stellen als Norm den Satz auf, daß 10 ccm Milch von gesunden Kühen, die mindestens 3 Wochen vorher geboren haben, bei Zusatz von 1 ccm Formalin-Methylenblaulösung (F. M.) im Wasserbad von 45° innerhalb 12 Minuten entfärbt werden. Schern weist indes in seiner Veröffentlichung gleichzeitig darauf hin, daß die Reaktion ausbleibt, wenn es sich um Milch aus einem kranken Euter handelt, oder wenn zu dem Versuch Milch von Kühen verwendet wird, die kurz zuvor geboren haben. In der andern Arbeit wird von Koning die Beobachtung Scherns bezüglich des Ausbleibens der Entfärbung bei Milch von frischmilchenden Kühen bestätigt. Bei der Untersuchung von kranker Milch aber kommt Koning zu einem andern Resultat als Schern; er hat gefunden, daß solche Milch Formalin-Methylenblaulösung auffallend rasch entfärbt.

Da die Untersuchungsergebnisse der beiden Autoren in manchen Punkten nicht ganz übereinstimmen, erschien es uns angezeigt, weitere diesbezügliche Untersuchungen anzustellen, um so mehr, als Koning und Schern geneigt sind, aus ihren Untersuchungsergebnissen zum Teil ziemlich weitgehende Folgerungen zu ziehen, Folgerungen, die, falls ihre Richtigkeit bestätigt werden könnte, der Schardinger-Reaktion eine große Bedeutung für die praktische Milchhygiene und für das Molkereiwesen sowohl als für die forensische Veterinärmedizin verleihen würden.

Eigene Untersuchungen.

I. Milch von frischmilchenden Kühen.

Bei Anstellung unserer Untersuchungen war es uns zunächst darum zu tun, festzustellen, ob bei Milch von „frisch-

[1]) Koning, Biologische und biochemische Studien über Milch. Leipzig 1908.

[2]) Schern, Diese Zeitschr. 18, 261, 1909.

milchenden"[1]) Kühen die Schardingersche Reaktion tatsächlich ausbleibt, sodann, wie lange nach der Geburt das Nichteintreten der Reaktion bestehen bleibt, und ferner, ob sich bezüglich der Zeit des Wiedereintritts der Reaktion eine gewisse Gesetzmäßigkeit nachweisen läßt. Endlich sollten unsere Untersuchungen dartun, ob in der Milch „frischmilchender" Kühe das Schardinger-Ferment überhaupt fehlt.

Zu den gedachten Zwecken verwandten wir für die Untersuchungen ausschließlich Milch von Kühen, die in der geburtshilflichen Klinik der hiesigen tierärztlichen Hochschule geboren hatten, von denen also Zeit und Verlauf der Geburt ganz genau bekannt war. Die Milch der einzelnen Tiere wurde unmittelbar nach der Geburt und dann weiterhin in gewissen Zeitabschnitten möglichst oft und möglichst lange, bzw. bis zum bleibenden Wiedererscheinen der normalen Schardinger-Reaktion untersucht. Die Entnahme der Milch erfolgte teils durch gewöhnliches Melken, teils auf sterile Weise. In letzterem Falle bedienten wir uns nach vorherigem Abwaschen und nach Desinfektion des Euters und speziell der Zitzen mittels Alkohols, der von Trommsdorff (l. c.) als sehr zweckmäßig empfohlenen sterilen Melkröhrchen. Wir haben übrigens die Brauchbarkeit dieser Art von Milchentnahme schon gelegentlich von zu andern Zwecken vorgenommenen Milchuntersuchungen[2, 3]) kennen und schätzen gelernt. Auf die Anlegung von Plattenkulturen zur Kontrolle der Sterilität der Milch glaubten wir verzichten zu dürfen, nachdem der eine von uns (Seibold, l. c.) früher schon durch zahlreiche systematische Untersuchungen nachgewiesen hat, daß man auf die beschriebene Weise eine vollständig sterile Milch oder doch eine Milch erhält, die nur eine ganz geringe, für unsere Untersuchungszwecke belanglose Keimzahl aufweist.

Zu den Untersuchungen wurde die aus allen vier Eutervierteln zusammengemolkene Milch — in den Tabellen kurz als Mischmilch be-

---

[1]) Wir gebrauchen hier den Ausdruck „frischmilchend" und später „altmilchend" im Sinne Scherns; wir wollen damit das ungefähre Stadium der Lactation der Kühe, die wir zu unsern Versuchen herangezogen haben, bezeichnen.

[2]) Bub, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Orig. 27, 321.

[3]) Seibold, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 55, 301

zeichnet — verwendet. Wo aus besonderen Gründen die Milch einzelner Viertel untersucht worden ist, ist dies ausdrücklich bemerkt worden. Wir benutzten im allgemeinen ein Wasserbad von 45°; in den meisten Fällen wurden gleichzeitig ein oder zwei Kontrollversuche bei 65° angesetzt. In allen Fällen kam das von Schern zusammengestellte und für die Schardinger-Probe empfohlene Thermodiaskop zur Anwendung, das von Schern in den Monatsh. f. prakt. Tierheilkunde 21, 171 näher beschrieben und abgebildet ist und die Untersuchungen nicht unwesentlich vereinfacht.

Wir haben stets zwei, zuweilen auch drei gleiche Proben gleichzeitig untersucht. Wir verwandten stets 10 ccm Milch, denen jeweils 1 ccm des von Paul Altmann in Berlin bezogenen Schardinger-Reagenses (5 ccm gesättigte, alkoholische Methylenblaulösung + 5 ccm Formalin + 190 ccm Wasser) zugesetzt wurde. Bei Fall 1 wurde neben der steril und der nicht steril entnommenen Colostralmilch zur Prüfung der Farbstofflösung gleichzeitig je eine Probe gewöhnlicher Handelsmilch mituntersucht. Im übrigen wurden die Milchproben möglichst bald nach der Entnahme und dann innerhalb der nächsten 24 Stunden in verschieden großen Intervallen, insgesamt 3 bis 5mal, untersucht, wobei die Milch vom einen zum andern Tag bei Zimmertemperatur (15 bis 20°) aufbewahrt wurde. Im übrigen wurden die einzelnen Reaktionszeiten der verschiedenen Untersuchungen nur dann in die Tabellen aufgenommen, wenn sie wesentliche Abweichungen von denen der 1. Untersuchung zeigten. Bevor der Versuch angesetzt wurde, wurden die Milchproben gründlich geschüttelt, so daß sich der Rahm in der Milch gleichmäßig verteilte. Nach dem Abpipettieren der Milch und der Farbstofflösung wurden die Röhrchen nach Verschluß mit dem Daumen so oft umgekehrt, bis die Milch gleichmäßig blau gefärbt war und kein Farbstoff mehr an der Wand des Röhrchens haftete. Dann wurden die Proben ins Wasserbad gestellt.

Da Schern das frühere oder spätere Wiederauftreten der Schardinger-Reaktion in der Milch von frischmilchenden Kühen mit dem Saugenlassen des Kalbes am Euter in Zusammenhang bringen will, so wurde auch diesem Umstand Beachtung geschenkt.

Es braucht nicht besonders hervorgehohen zu werden, daß die die Untersuchungsmilch liefernden Kühe jeweils auf ihren Gesundheitszustand und besonders eingehend auf gesunde Beschaffenheit des Euters untersucht worden sind. Wo sich irgendwelche Abweichungen von der Norm gezeigt haben, wurde dies besonders bemerkt.

Die Entfärbung der Mischungen trat in der Regel von unten nach oben ein; wo ein anderes Verhalten sich zeigte, wurde es in den Tabellen besonders hervorgehoben. In manchen Fällen ist die Entfärbung so rasch und gleichmäßig erfolgt, daß nicht festgestellt werden konnte, ob die Entfärbung von unten oder von oben her erfolgt ist.

Alles Weitere ist aus den tabellarisch zusammengestellten Protokollauszügen zu entnehmen, die wir nunmehr folgen lassen:

Tabelle I.

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der Milch: sterilen	Reaktionszeit der Milch: nicht sterilen	Reaktionszeit der Milch: Kontroll-	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7	8
Fall 1. Kuh Nr. 112, Ostfriese, 6 J. alt, hat am 5. VI. 10 10^h nachts normal geboren.	11. VI. 10 10^h v.	1.	$10^h 40'$ v.	6′	8′	5′	Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch. Zur Kontrolle wurde gewöhnl. (altmelkige) Handelsmilch untersucht. Die Entfärb. tritt deutlich von unten nach oben ein.
		3.	$2^h 52'$ n.	8′	16′	8′	
		4.	$5^h 18'$ n.	>30′ [1]	27′	10′	
Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Es besteht Hyperämie u. Schwellung des h. r. Euterviertels u. Schwellung der zugehör. Lymphdrüse. Allgemeinbefinden ist nicht gestört.	13. VI. 9^h v.	1.	$9^h 27'$ v.	13′	18′	24′	
				12′	16′	21′	Mischmilch aus allen 4 Vierteln. Die Handelsmilch erscheint gleich beim Kauf geronnen; bei der Alkoholprobe zeigen sich feine Gerinnsel.
		2.	$11^h 45'$ v.	11′	14′	27′	
		3.	$2^h 48'$ n.	19′	24′	16′	
		4.	$4^h 44'$ n.	22′	23′	10′	
	16. VI. $8^h 50'$ v.	1.	$9^h 10'$ v.	10′	>40′		Der Versuch konnte nicht fortgesetzt werden, da die Kuh verkauft wurde.
Fall 2. Kuh Nr. 136, Höhenrasse, hat am 15. VI. 10 abds. 8^h normal geboren. Nachgeb. rechtzeit. abgestoßen. Leichtes Euterödem. Allgemeinbefind. nicht gestört.	17. VI. $8^h 45'$ v.	1.	9^h v.	30′	80′		Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch. Die Milchproben und das Reagens werden abpipettiert.
		2., 3. u. 4.	$11^h 08'$ v.	>60′	>60′		
	18. VI.			"	"		
	20. VI.			"	"		
	22. VI.			"	"		
	1. VII. $8^h 45'$ v.	1.	$2^h 26'$ n.	—	9′		Bei Vornahme weiterer Untersuchungen am 5. u. 12. VII. ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede.
Fall 3. Kuh Nr. 138, Höhenrasse, 10 J. alt, hat am 17. VI. 10 12^h nachts gebor. Ausstoßung der Nachgeb. erfolgt erst am 20. VI. früh. Euter normal. Allgemeinbefind. nicht gestört.	20. VI. $8^h 30'$ v.	1.	10^h v.	>60′	>60′		Kalb saugt am Euter. Mischmilch.
	22. VI.			"	"		
	24. VI.			"	"		
	1. VII. 10^h v.	1.	$2^h 30'$ n.	—	16′		Kalb wird heute abgestoßen.
	5. VII. $3^h 30'$ n.	1.	$5^h 25'$ n.	—	>60′		Kuh zeigt Störung des Allgemeinbefind.; Temp. 39,9° C; Puls 75; Futteraufnahme, Wiederkäuen, Milchsekretion vermindert. Euter gesund. Kuh wird am 6. VII. wegen Metritis purul. geschlachtet.

[1]) >30′ = größer als 30′, d. h. innerhalb 30′ ist keine Entfärbung eingetreten.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 4. Kuh Nr. 141, Höhenrasse, 8 J. alt, hat am 23. VI. 10 morgens 3^h geboren; Ausstoßung der Fruchthüllen erfolgte rechtzeitig. Euter normal. Allgemeinbefinden nicht gestört.	23. VI. 8^h 30′ v.	1. 4.	8^h 51′ v. 5^h n.	9′ 8′	39′ >60′	Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch.
	24. VI. 8^h 45′	1.	9^h v.	25′	>90′	
	27. VI.	1.	8^h 51′ v.	>60′	>60′	Die 2. und 3. Untersuchung, sowie die Untersuchungen v. 29. VI. hatten dasselbe Ergebnis; Restmilch entfärbte in 10′. Das Kalb wurde am 4. VII. abgestoßen.
	6. VII. 9^h 30′ v.	1.	11^h 22′ v.	—	22′	
	18. VII. 9^h 45′ v.	1. 2.	11^h 24′ v. 4^h n.	— —	15′ 22′ >60′ [1]	
		3. 4.	6^h 10′ n. 9^h 54′ v.	— —	20′ 13′ 28′ [1]	Bei den Untersuchungen vom 25. VII., 1., 8. u. 16. VIII. schwanken die Reaktionszeiten bei 45° zwischen 11 u. 45′, bei 65° zwischen 8 u. 50′, bzw. ist nach 60′ nur eine Aufhellung festzustellen.
	23. VIII. 9^h 30′ v.	1.	10^h 30′ v.	—	17′ 40′ [1]	
		4.	9^h v.	—	6′ 6′ [1]	
	27. IX. 9^h 25′ v. 5^h 15′ n.	1 2. 1. 2.	10^h 25′ v. 2^h 16′ n. 8^h n. 9^h v.	— — — —	>60′ — [2] >60′ 3′ [3]	Bei den Untersuchungen vom 30. VIII., 7., 14. u. 21. IX. schwanken die Reaktionszeiten bei 45° zwischen 9 u. 29′, bei 65° zwischen 5 u. 29′, bzw. tritt in 60′ nur Aufhellung ein.
	24. X. 8^h 30′ v.	1.	11^h v.	—	>60′	Mischmilch. Allgemeinbefinden gut. Euter gesund.
Fall 5. Kuh Nr. 139, Höhenrasse, hat am 22. VI. 2^h früh geboren. Ausstoßung d. Nachgeburt am 22. VI. 6^h vorm. Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal.	23. VI. 8^h 30′ v.	1.	8^h 51′ v.	—	>60′	Kalb saugt a. Euter. Mischmilch. Gleiche Ergebnisse liefern die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 25. u. 27. VI. u. v. 1. VII. Desgl. die Untersuchungen bei der Milchentnahme am 6. VII.
	5. VII. 4^h n.	1.	5^h 25′ n.	—	30′	
	18. VII. 10^h 30′ v.	1.	11^h 24′ v.	— —	12′ 27′ [1]	
		4.	9^h 54′ v.	— —	9′ 5′ [1]	
	25. VII. 10^h 30′ v.	1. 2.	2^h 40′ n. 4^h 50′ n.	— —	24′ >60′	Bei den Untersuchungen vom 1., 8., 16. u. 30. VII. schwanken die Reaktionszeiten bei

[1]) Bei 65°.

[2]) Mit dem Rahm aus 60 ccm Milch tritt innerhalb 1 Stunde nur Aufhellung ein.

[3]) Rahm aus 150 ccm Milch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der Milch: sterilen	Reaktionszeit der Milch: nicht sterilen	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 5.	2. IX. 8h 40′ v.	1.	11h 48′ v.	—	9′	45° zwischen 4 u. 30′, bei 65° zwischen 2 u. 7′; am 1. VIII. war bei 65° nach 1 Stunde nur Aufhellung zu sehen.
				—	3′ [1])	
		4.	8h 40′ v.	—	7′	
				—	10′ [1])	
Fall 6. Kuh Nr. 137, Höhenrasse, 8 J. alt, hat am 25. VI. 10 abds. 8h geboren; Ausstoßung der Nachgeb. rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	27. VI. 10h v.	1.	10h 01′ v.	—	8′	Mischmilch; dieselbe ist noch deutlich gelb gefärbt (Colostralmilch).
	28. VI. 8h 30′ v.	1.	8h 49′ v.	>60′	>60′	Mischmilch. Kalb saugt.
	28. VI. 2h n.	1.	2h n.	—	6′	
		2.	4h n.	—	8′	
	30. VI. 8h 30′ v.	1.	9h v.	>60′	>60′	Desgl. die 2., 3., 4. Untersuchung und die vom 2. VII. Die betr. Restmilch entfärbt jeweils in 7 bis 12′.
	8. VII. 8h 45′ v.	1.	11h 18′ v.	—	12′	
				—	20′ [1])	Desgl. die 2. und 3. Unters.
	13. VII. 9h v.	1.	11h 30′ v.	—	16′	Bei den Untersuchungen am 22. u. 26. VII. betragen die Reaktionszeiten bei 45° 3 bis 9′, bei 65° 2 bis 4′. Kalb wurde am 22. VII. abgestoßen.
		2.	2h 30′ n.	—	25′	
		3.	4h 30′ n.	—	>60′	
		4.	8h 44′ v.	—	14′	
	28. VII. 9h v.	1.	9h 43′ v.	—	9′	
				—	8′ [1])	
Fall 7. Kalbin Nr. 131, Höhenrasse, $2^1/_2$ J. alt, hat am 25. VI. 10 nachts 11h 30′ geboren. Ausstoßg. der Nachgeburt erfolgte rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euterödem.	27. VI. 10h v.	1.	10h v.	—	10′	Mischmilch.
		2.	12h v.	—	13′	
		3.	4h n.	—	18′	
		4.	6h 10′ n.	—	20′	
	28. VI. 8h 30′ v.	1.	8h 49′ v.	25′	>60′	Wie oben. Kalb saugt.
		2.	10h 46′ v.	>60′	—	
	2h n.	1.	2h n.	—	12′	
		2.	4h n.	—	20′	
	30. VI. 8h 30′ v.	1.	10h 20′ v.	>60′	>60′	Gleiche Ergebnisse liefern die 2. u. 3. Untersuchung, sowie die vom 2. VII. Restmilch entfärbt jeweils in 6 bis 9′.
	6. VII. 9h 15′ v.	1.	11h 32′ v.	—	7′	Die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die Unters. v. 18. u. 25. VII. liefern keine wesentlich verschied. Ergebnisse. Bei 65° tritt Entfärb. teilweise schon in 2 bis 3′ ein. Kalb am 20. VII. abgestoßen.

[1]) Bei 65°.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der Milch: sterilen	Reaktionszeit der Milch: nicht sterilen	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 8. Kuh Nr. 140, Simmentaler Rasse, hat am 1. VII. 10 normal gebor. Nachgeburt rechtzeit. abgegangen. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	4. VII. 5h 30′ v.	1.	8h 30′ v.	—	>60′	Mischmilch. Das Kalb saugt. Gleiche Ergebnisse liefern die 2., 3. u. 4. Untersuchung, sowie die vom 6. VII. Restmilch entfärbt jeweils in 7 bis 12′.
	15. VII. 5h 30′ n.	1.	8h 11′ n.	—	15′	
		2.	9h 57′ v.	—	14′ 27′ [1]	
	27. VII. 3h n.	1.	5h 35′ n.	—	30′	
				—	>60′ [1]	
		2.	8h 32′ v.	—	>60′	
	10. VIII. 9h v.	1.	11h v.	—	13′	Das Kalb ist abgestoßen.
				—	180′ [1]	Milch, die gewonnen wurde, nachdem dem Euter 150 ccm Milch entnommen waren, entfärbte bei 45° in 6 bis 12′, bei 65° in 30 bis 44′.
	17. VIII. 9h v.	1.	11h v.	—	24′	Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.
				—	>60′ [1]	Milch, die gewonnen wurde, nachdem dem Euter 150 ccm entzogen waren, entfärbte bei 45 u. 65° innerhalb 4 bis 10′.
	31. VIII. 10h v.	1.	11h v.	—	>60′	Gleiche Ergebnisse lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 8., 15., 22., 28. IX. u. v. 25. X. sowohl bei 45° als bei 65°. Durch Stehenlassen gewonnener Rahm entfärbte in 4 bis 15′.
Fall 9. Kuh Nr. 142, Simmentaler Kreuzung, hat am 9. VII. 10 mittags 12h geboren. Ausstoßg. der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	11. VII. 8h 30′ v.	1.	9h v.	>60′	>60′	Kalb saugt. Mischmilch. Dasselbe Ergebnis lieferten die 2., 3., 4. u. 5. Unters., sowie die vom 13., 14. u. 16. VII. Restmilch entfärbte jeweils in 9 bis 14′.
	16. VII. 5h 30′ v.	1.	10h v.	—	>60′	
				—	14′ [2]	
		2.	3h 24′ n.	—	>60′	
				—	7′ [2]	
	25. VII. 11h v.	1.	2h 40′ n.	—	12′	
					>60′ [1]	Kalb ist am 28. VII. abgestoßen worden.
	1. VIII. 9h 15′ v.	1.	10h 51′ v.	—	5′	
				—	2′ [1]	Genau so wie die Untersuchgn. v. 1. VIII. verliefen die v. 8. u. 12. VIII.

[1]) Bei 65°.

[2]) Restmilch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der Milch: sterilen	Reaktionszeit der Milch: nicht sterilen	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 10. Kuh Nr. 144, Höhenrasse, hat am 13. VII. 10 vorm. 9h normal gebor.; Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Allgemeinbefinden ist nicht gestört. Euter normal.	14. VII. 8h 30′ v.	1.	10h 35′ v.	6′ 4′ [1]	6′ 5′ [1]	Kalb saugt. Mischmilch.
	16. VII. 8h 30′ v.	1. 2.	10h v. 12h v.	— —	14′ >60′ [1]	Bei den Untersuchungen vom 14. u. 16. VII. entfärbte Restmilch bei 45° in 4 bis 6′, bei 65° in 2½ bis 4′.
	18. VII. 6h 30′ v.	1.	11h v.	—	>60′	Dasselbe Ergebn. lieferten auch die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 20. u. 26. VII., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch entfärbt jeweils in 4—13′.
	2. VIII. 6h v.	1.	10h v.	— —	30′ >60′ [1]	Allgemeinbefind. gut; Freßlust gering. Euter norm. Kalb wird heute abgesetzt. Die Körpertemp. ist häufigen Schwankgn. unterworfen; Kuh zeigte bald Fieber, bald war sie fieberfrei. Restmilch entfärbte in 2½—5′.
	6. VIII. 6h 30′ v.	1.	8h 30′ v.	—	>60′	Gleiche Ergebnisse bei 65°. Restmilch entfärbte bei 45° in 4—5′, bei 65° in 1½—2½′.
Fall 11. Kuh Nr. 145, Höhenrasse, hat am 14. VII. 10 nachm. 3h normal geboren; Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Allgemeinbefind. gut; h. r. Euterviertel hyperämisch.	15. VII. 5h 30′ v.	1.	11h 14′ v.	—	>60′	Kalb saugt. Mischmilch; der Milch sind rote Blutkörperch. beigemischt. Am 18. VII. war d. Euter wieder normal. Dasselbe negat. Ergebnis lieferten auch die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 18. u. 20. VII. Restmilch entfärbte bei 45° in 7—30′, bei 65° in 3—27′.
	25. VII. 11h v.	1.	2h 40′ n.	— —	10′ 25′ [1]	
	1. VIII. 10h v.	1.	10h 51′ v.	—	>60′	Dasselbe negat. Ergebnis lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 8. u. 16. VIII. Nur bei der 4. Unters. v. 8. VIII. trat nach 20′ Entfärbung ein. Kalb wurde am 14. VIII. abgestoßen.
	23. VIII. 9h v.	1.	10h 50′ v.	— —	10′ 55′ [1]	
	30. VIII. 11h v.	1.	11h 30′ v.	—	12′	Wie oben. Mischmilch.
		4.	8h 40′ v.	— — —	41′ [1] 10′ 5′ [1]	
	7. IX. 10h v.		11h 22′ v.	—	>60′	Wie oben. Mischmilch.

[1]) Bei 65°.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 11.	14. IX. 9h 45′ v.	1.	10h 36′ v.	—	>60′	Wie vorher (S. 302. Dasselbe negative Ergebnis lieferten die 2. u. 3. Unters., sowie die vom 21. IX., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°.
	27. IX.	1.	10h 25′ v.	—	>60′	
	9h v.	2.	2h 16′ n.	—	25′ [1])	Allgemeinbefind. nicht gestört; hinteres r. Euterviertel zeigt sich verhärtet, nicht schmerzhaft, r. Euterlymphdrüse vergrößert. Mischmilch.
	5h 30′ n.	1.	8h 05′ n.	—	>60′	
		2.	9h 07′ v.	—	60′ [2])	
	24. X. 8h 30′ v.	1.	10h 57′ v.	—	>60′	
Fall 12. Kuh Nr. 146, Gelbschecke, Höhenrasse, hat am 15. VII. 10 vorm. 6h normal geboren; die Ausstoßung der Nachgeburt ist rechtzeitig erfolgt.	15. VII. 9h v.	1.	11h 14′ v.	—	20′	Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal. Kalb saugt. Mischmilch.
				—	6′ [3])	
	18. VII. 5h 30′ v.	1.	8h 34′ v.	—	>60′	Wie oben. Mischmilch. Dasselbe negat. Ergebnis lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die Untersuchungen v. 20. u. 26. VII., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch entfärbte bei 45° in 6—32′, bei 65° in 2—3′.
	4. VIII. 8h v.	1.	9h 16′ v.	—	10′	Kalb ist abgestoßen, sonst wie oben. Mischmilch.
	9. VIII. 9h v.	1.	10h 28′ v.	—	6′	Wie oben. Die Untersuchungen vom 12. u. 16. VIII. lieferten keine wesentlich verschied. Ergebnisse.
Fall 13. Kuh Nr. 143, Gelbschecke, Höhenrasse, hat am 15. VII. 10 vorm. 6h 15′ normal geboren; Nachgeburt ist rechtzeit. ausgestoßen worden.	15. VII. 9h v.	1.	11h 14′ v.	—	>60′	Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal. Kalb saugt. Mischmilch.
				—	>60′ [3])	
		2.	2h 52′ n.	—	>60′	
				—	28′ [3])	
	18. VII. 5h 30′ v.	1.	8h 34′ v.	—	>60′	Wie oben. Mischmilch. Abgesehen von der 4. Unters., bei der in 17′ Entfärb. eintrat, lieferten die 2. u. 3. Unters., sowie die Unters. v. 20. u. 25. VII. u. v. 1. VIII. dasselbe neg. Ergebnis, u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch

[1]) Rahm aus 60 ccm Milch.

[2]) Rahm aus 100 ccm Milch.

[3]) Restmilch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der Milch: sterilen	Reaktionszeit der Milch: nicht sterilen	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 13.						entfärbte bei 45° in 4—30′, bei 65° in $2^1/_2$—4′.
	8. VIII. 9h v.	1.	10h 21′ v.	—	40′	Wie vorher. Kalb ist abgestoßen. Mischmilch.
				—	>60′ [1]	
	16. VIII. 9h v.	1.	11h 06′ v.	—	8′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	15′ [1]	
		4.	8h 32′ v.	—	$7^1/_2$′	
					3′	
	23. VIII. 8h 45′ v.	1.	10h 50′ v.	—	5′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	5′ [1]	
		4.	9h 08′ v.	—	5′	
				—	2′ [1]	
	30. VIII. 8h 45′ v.	1.	11h 31′ v.	—	10′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	22′ [1]	
		4.	8h 40′ v.	—	6′	
				—	3′ [1]	
	7. IX. 9h v.	1.	11h 22′ v.	—	>60′	Wie vorher. Mischmilch.
		2.	4h 18′ n.	—	20′	
		3.	6h 42′ n.	—	18′	
		4	9h 06′ v.	—	7′	
				—	4′ [1]	
	14. IX. 8h 30′ v.	1.	10h 36′ v.	—	>60′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	>60′ [1]	
	21. IX. 9h 20′ v.	1.	10h 56′ v.	—	23′	Wie vorher. Mischmilch.
					>60′ [1]	
	27. IX. 9h 10′ v. 6h 30′ n.	1.	10h 25′ v.	—	>60′	Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal. Rechte Euterlymphdrüse geschwollen. Mischmilch.
		2.	2h 16′ n.	—	80′ [2]	
		1.	8h 05′ ab.	—	>60′	
		2.	9h 07′ v.	—	nach 60′ weiß mit blauem Schimmer [3]	
	24. X. 5h 30′ n.	1.	8h 14′ ab.	—	21′	
		2.	8h 41′ v.	—	16′	

[1] Bei 65°.

[2] Rahm aus 60 ccm Milch.

[3] Rahm aus 150 ccm Milch; Rahmschicht gering.

Zu den Tabellen haben wir zunächst zu bemerken, daß bei Fall 1, 2, 3, 5 und 11 eine mehr oder weniger starke Hyperämie und Ödem des Euters bestanden hat, was ja bei Kühen vor und unmittelbar nach dem Gebären die Regel ist. Wir möchten daher die Milch dieser Tiere nicht als pathologisch ansehen. Dagegen waren die Tiere des Falles 3 und 10 fieberhaft erkrankt, weshalb die Untersuchungsergebnisse der als abnorm anzusehenden Milch dieser beiden Tiere für unsere Betrachtungen ausschieden.

Wir haben oben schon erwähnt, daß Koning und Schern es als Regel aufstellen, daß die Milch von gesunden Kühen etwa 3 Wochen nach dem Gebären keinerlei Abweichungen von der Norm mehr aufzuweisen haben, daß somit die frische, ungekochte Milch „altmilchender" Kühe das Schardinger-Reagens im Wasserbad von 45° innerhalb 12 Minuten entfärbt. Aus den vorstehenden Protokollen entnehmen wir, daß die Schardinger-Reaktion bei Colostralmilch, die unmittelbar nach der Geburt dem Euter entzogen worden ist, in der Regel bald, wenn auch nicht immer, schon innerhalb 12 Minuten eintritt und während der ersten 2 bis 3 Tage ausnahmsweise einmal auch noch in den nächstfolgenden Tagen nach der Geburt nachzuweisen ist; gleiche Ergebnisse in dieser Beziehung hatte auch schon Schern (l. c. S. 271 und 273), während Koning (l. c. S. 35 und 89) fand, daß die Milch während der Colostralperiode nicht oder nur sehr langsam entfärbt. In den folgenden Tagen aber verschwindet die Reaktion, um nach einer mehr oder weniger langen Zeit wieder zum Vorschein zu kommen. Es haben also unsere Untersuchungen die Wahrnehmungen Konings und Scherns, daß in Milch von „frischmilchenden" Kühen die Schardinger-Reaktion ausbleibt oder wenigstens nicht in der geforderten Zeit von 12 Minuten eintritt, im allgemeinen bestätigt.[1]) Es gibt jedoch Ausnahmen nach der einen und anderen Richtung; wir haben Fälle verzeichnet, wo — abgesehen von der Entfärbung der Milch unmittelbar nach der Geburt — die Reaktion auffallend bald nach der Geburt sich wieder zeigte (siehe Fall 2, 7, 9 und 12), und andrerseits solche, wo die Entfärbung außerordentlich lange Zeit nach der Geburt ausgeblieben ist (siehe Fall 4, 8, 11 und 13). Auch die zwischen diesen Extremen liegenden Fälle variieren in der Zeit so stark, daß es schwer ist, mittlere Werte anzugeben; man könnte allenfalls sagen, daß der Wiedereintritt der Schardinger-Reaktion innerhalb 3 bis 8 Wochen nach der Geburt in der Regel zu erwarten ist.

Bestimmte Ursachen für ein sehr frühes oder sehr spätes Erscheinen der Schardinger-Reaktion nach der Geburt haben wir, wenn

[1]) Erst bei Abschluß unserer Arbeit erhielten wir Kenntnis von der Veröffentlichung: Sassenhagen, Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- und Mastitismilch, Stuttgart 1910. Was dort über die Beziehungen der Colostralmilch zum Schardinger-Reagens gesagt ist, stimmt im großen ganzen mit unseren Untersuchungsergebnissen überein.

wir von den beiden oben erwähnten Erkrankungsfällen absehen, nicht nachweisen können. Auch Schern hat in mehreren Fällen ein auffallend frühes Eintreten der Reaktion nach der Geburt feststellen können (l. c. S. 271 und 272) und wollte dies auf das Nichtsaugenlassen des Kalbes am Euter der Mutter zurückführen. Wir haben keine Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Annahme finden können; denn bei allen unseren frischmilchenden Kühen, deren Milch wir untersucht haben, haben die Kälber längere Zeit am Euter gesogen. Trotzdem haben wir die bedeutenden Schwankungen im Wiederauftreten der Reaktion.

Daß schwere, insbesondere mit Fieber verlaufende Allgemeinerkrankungen und speziell Erkrankungen des Euters von Einfluß auf die Schardinger-Reaktion sind, geht aus den Fällen 3 und 10 hervor. Ob aber rasch vorübergehende, leichte, klinisch nicht wahrnehmbare Allgemeinerkrankungen, oder solche des Euters die Milchsekretion in der Weise beeinflussen können, daß der die Reaktion auslösende Körper das eine Mal früher als sonst nach der Geburt auftritt, das andere Mal verschwindet, ist zweifelhaft; ganz von der Hand weisen läßt sich diese Vermutung nicht, da wir auf Grund sonstiger Beobachtungen wohl wissen, daß der betreffende Körper sehr empfindlich ist, aber nicht darüber orientiert sind, welcher Art und Herkunft er ist.

Eine vorübergehende Euterhyperämie oder ein Euterödem ist offenbar von keinem merklichen Einfluß auf den Ablauf der Reaktion, wie die Fälle 1, 2, 3 und 5 zeigen.

Eine besondere Stellung nehmen die Fälle 8, 11 und 13 ein. Bei Fall 11 ist 10 Tage nach der Geburt die Schardinger-Reaktion vorhanden, dann verschwindet sie, um nach einigen Wochen sich wieder zu zeigen und nach weiteren 14 Tagen wieder zu verschwinden. Ähnliche Schwankungen im Auftreten und Ausbleiben der Reaktion zeigen auch die beiden anderen eben erwähnten Fälle. Bei der Kuh Nr. 8 konnten abnorme Zustände irgendwelcher Art nicht aufgefunden werden. Bei Fall 11 zeigte sich das hintere rechte Euterviertel der Kuh verhärtet, die zugehörige Euterlymphdrüse vergrößert. Bei Kuh Nr. 13 hat sich nur die eine Euterlymphdrüse vergrößert gezeigt. In beiden Fällen aber hat es sich um alte, völlig abgelaufene Prozesse gehandelt; wir möchten sehr bezweifeln, daß diese von Einfluß auf die Beschaffenheit der Milch gewesen sind, um so mehr, als bei anderen Untersuchungen (Alkoholprobe) die Milch als gesund und einwandfrei sich erwiesen hat.

Bei der Milch einzelner Kühe ist die Reaktion außerordentlich spät nach der Geburt oder zurzeit des Abschlusses unserer Untersuchungen überhaupt noch nicht bzw. nicht in der geforderten Zeit zum Vorschein gekommen, obwohl in den einzelnen Fällen schon 101 bzw. 102, 116 und 123 Tage seit der letzten Geburt verflossen waren und besondere Gründe, wie Erkrankungen usw., nicht vorlagen. Auch Trommsdorf und Schern haben je bei einer offenbar von einer „alt-

milchenden" Kuh herrührenden Milch Ausbleiben der Reaktion, und Schern in einem weiteren Falle verzögertes Eintreten der Entfärbung ohne nachweisbare Ursache wahrgenommen. Brand wollte bei 2 Kühen, deren Milch sich dem Schardinger-Reagens gegenüber abnorm verhielt, die Fettarmut als Ursache hierfür beschuldigen. Auf Fettarmut der Milch konnten wir in unseren Fällen die Verzögerung bzw. das Ausbleiben der Reaktion nicht beziehen, denn die betreffenden Milchproben zeigten beim Stehenlassen oder Zentrifugieren reichliche Fettabscheidung.

Es bleibt also die Ursache für das abnorme Verhalten der Milch in den erwähnten Fällen dunkel. Vielleicht ist die Ursache in inneren, uns nicht näher bekannten, nach außen sich nicht bemerkbar machenden Störungen in der Milchsekretion oder in einer besonderen Empfindlichkeit des die Entfärbung herbeiführenden Enzyms zu suchen. Wir dürfen wohl auch annehmen, daß unter den einzelnen Tieren große individuelle Schwankungen in der Enzymproduktion bestehen: Die eine Kuh besitzt die Eigenschaft, viel Enzym zu liefern, die andere hat eine geringere Fähigkeit hierzu. Dafür, daß die Rasse von Einfluß auf die Enzymproduktion ist, haben wir keine Anhaltspunkte gefunden. Jedenfalls steht so viel fest, daß das zeitliche Wiederauftreten der Schardinger-Reaktion in der Milch nach der Geburt großen Schwankungen unterliegt, Schwankungen, deren Ursachen häufig außer dem Bereich unserer Feststellungen liegen. So kommt es, daß wir bezüglich der Zeit des Wiedereintretens der Schardinger-Reaktion nach der Geburt eine bestimmte Norm nicht aufstellen können.

Übrigens haben unsere Untersuchungen ergeben, daß das Schardinger-Enzym nie, auch nicht in der Milch frischmilchender Kühe, ganz fehlt. Ausgehend von der von verschiedenen Untersuchern (Brand, Smidt, Koning) und auch von uns festgestellten Tatsache, daß der Rahm einer Milch viel rascher entfärbt, als die Milch selbst, haben wir von einigen Milchproben zu einer Zeit, wo sie die Schardinger-Reaktion nicht gegeben haben, den Rahm durch Stehenlassen oder Zentrifugieren gewonnen und diesen mit einem entsprechenden Quantum der Formalin-Methylenblaulösung ver-

setzt. Wir haben regelmäßig eine mehr oder weniger vollkommene Entfärbung, gewöhnlich in verhältnismäßig kurzer Zeit erhalten (siehe Fall 4, 8, 11 und 13).

Wir können also das Schardinger-Enzym im Rahm gewissermaßen in konzentrierter Form erhalten. Dieselben Wahrnehmungen haben auch Koning und nach ihm wir bei Anwendung des fraktionierten Melkens gemacht. Bekanntlich besitzt die aus dem Euter zuerst ermolkene Milch (= Anfangsmilch) den geringsten Fettgehalt; dieser steigt während des Melkens (= Mittelmilch) an, und in der zuletzt ermolkenen Milch (= Restmilch) erhalten wir die fettreichste. Konings sowohl als unsere in dieser Richtung angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß Restmilch die Reaktion am raschesten, Mittelmilch langsamer und Anfangsmilch am spätesten liefert (siehe Fall 4, 6, 7, 8, 9, 12 und 13). Diesem Umstande ist wohl die Tatsache zuzuschreiben, daß Schern bei seinen Versuchen durchschnittlich rascheres Eintreten der Entfärbung erzielt hat; denn er hat, wie aus seiner Bemerkung auf S. 265 dieser Zeitschrift 18, 1909 hervorgeht, die Milch nach Beendigung des Abendmelkgeschäfts entnommen, hat also zu seinen Versuchen die fettreiche Restmilch verwendet.

Auf eine Differenz im Fettgehalt sind jedenfalls auch die Unterschiede in den Reaktionszeiten der morgens und der nachmittags 2 Uhr gewonnenen Milch des Falles 6 (siehe Untersuchung vom 28. VI. 1910) und des Falles 7 (siehe Untersuchung vom 28. VI. 1910) zu erklären: Die morgens entzogene Milch war fettarme Anfangsmilch, die nachmittags, kurze Zeit nach dem Saugen des Kalbes gewonnene war fettreiche Restmilch. Zwischen Morgen- und Abendmilch haben wir keinen wesentlichen Unterschied finden können.

Wie weitere, in den obigen Tabellen nicht enthaltene Untersuchungen, die wir zwecks Studiums des Verhältnisses zwischen Fettgehalt und Reaktionszeit angestellt haben, gezeigt haben, steht der Enzymgehalt einer Milch nicht in direktem Verhältnis zu ihrem Fettgehalt. Wie oben schon erwähnt, haben wir zum Teil sehr fettreiche Milchen untersucht, die nicht entfärbt haben. Bei einer Serie von Milchproben haben wir die Schardingersche Probe ausgeführt und gleichzeitig den Fettgehalt dieser Milchen nach der Gerberschen Sal-

methode ermittelt. Dabei konnte zuweilen beobachtet werden, daß Milch mit hohem Fettgehalt die Schardinger-Reaktion gar nicht oder sehr verspätet gab, während fettarme Milch die Reaktion prompt lieferte. Stets aber hat der Rahm rascher entfärbt als die zugehörige Milch oder vollends als die Magermilch. Aus diesen Versuchen dürfen wir den Schluß ziehen, daß das Schardinger-Enzym eine gewisse Affinität zu den Fettkügelchen der Kuhmilch besitzt, es geht in den Rahm über, wird in ihm angereichert, so daß wir es dort in konzentrierter Form antreffen und mit dem Rahm Entfärbung erzielen können, wo wir dies mit der Milch nicht erreicht haben; wenn wir einer Milch, die die Schardinger-Reaktion gibt, den Rahm entziehen, so entfärbt die Magermilch nicht mehr; das Enzym ist in den Rahm übergegangen.

Das Enzym ist aber kein integrierender Bestandteil der Fettkügelchen, wie Seligmann in der Zeitschr. f. Hygiene 58, 1 nach unserer Auffassung ganz richtig sagt, sondern es folgt ihnen wie den Caseinpartikelchen nur nach physikalischen Gesetzen. Wenn dem nicht so wäre, müßte ja jede fetthaltige Milch entfärben; und ferner müßte die Menge des Enzyms direkt proportional der Höhe des Fettgehaltes der betreffenden Milch sein; dies ist aber nicht der Fall, wie wir durch Untersuchungen von durch fraktioniertes Melken gewonnener Milch festgestellt haben. Wir haben den Fettgehalt der einzelnen Proben und parallel damit das Verhalten dieser dem Schardinger-Reagens gegenüber bestimmt. Wir haben keine volle Parallelität der Höhe des Fettgehalts mit der Schnelligkeit des Eintritts der Reaktion, d. h. mit der Menge des vorhandenen Enzyms finden können.

Wir haben oben erwähnt, daß das Schardinger-Enzym stets in der Milch, auch in der von frischmilchenden Kühen, wenn auch nur in Spuren, vorhanden ist, da in den betreffenden Milchen regelmäßig wenigstens eine mehr oder weniger deutliche Aufhellung zu Hellblau eintritt und da mit dem Rahm die Reaktion jederzeit zu erzielen ist. Daß tatsächlich das Schardinger-Enzym auch in der Milch „frischmilchender" Kühe vorhanden ist, haben wir auch noch durch drei weitere Versuche nachweisen können. Wir haben auf der einen Seite Milch, die sicher entfärbt hat, mit nicht entfärbender Colostral-

milch, und auf der andern Seite dieselbe Milch mit Wasser je in verschiedenen Verdünnungen vermischt. Über die nähere Anordnung der Versuchsreihen gibt nachstehende Übersicht Auskunft.

Mischung	Reaktionszeit I	II	III
9 Teile Kuhmilch + 1 Teil Colostrum	19′	$4\frac{1}{2}$′	$6\frac{1}{2}$′
8 „ „ + 2 Teile „	24′	5′	$7\frac{1}{2}$′
7 „ „ + 3 „ „	27′	6′	$8\frac{1}{2}$′
6 „ „ + 4 „ „	34′	$6\frac{1}{4}$′	7′
5 „ „ + 5 „ „	48′	8′	9′
4 „ „ + 6 „ „	nach 60′ hellblau	10′	12′
3 „ „ + 7 „ „	> 60′	$11\frac{1}{2}$′	16′
2 „ „ + 8 „ „	> 60′	20′	38′
1 „ „ + 9 „ „	> 60′	nach 60′ Kuppe weiß	nach 60′ hellblau
0 „ „ + 10 „ „	> 60′	> 60′	> 60′

Mischung	Reaktionszeit I	II	III
9 Teile Kuhmilch + 1 Teil Wasser	19′	$4\frac{1}{2}$′	$6\frac{1}{2}$′
8 „ „ + 2 Teile „	25′	5′	$7\frac{1}{2}$′
7 „ „ + 3 „ „	38′	6′	9′
6 „ „ + 4 „ „	nach 60′ hellblau	$6\frac{1}{4}$′	14′
5 „ „ + 5 „ „	> 60′	8′	nach 60′ hellblau
4 „ „ + 6 „ „	> 60′	13′	> 60′
3 „ „ + 7 „ „	> 60′	n. 60′ leichte Aufhellung	> 60′
2 „ „ + 8 „ „	> 60′	> 60′	> 60′
1 „ „ + 9 „ „	> 60′	> 60′	> 60′
10 „ „ + 0 „ „	13′	4′	6′

Vergleichen wir die Reaktionszeiten der Mischungen Milch + Colostrum der Serien I, II und III je mit den entsprechenden Serien der Mischungen Milch + Wasser, so sehen wir, daß bei den ersteren die Entfärbung rascher eingetreten ist als bei der mit Wasser verdünnten Milch; es muß also im ersteren Gemisch ein Körper vorhanden sein, der zur Entfärbung der F. M. beihilft, und das kann im vorliegenden Falle nur das in der Colostralmilch enthaltene Schardinger-Enzym sein. Die Unterschiede treten um so deutlicher hervor, je mehr Colostrum bzw. Wasser zugesetzt ist.

Bemerkenswert ist auch, daß, je mehr die frühzeitig (in 13, bzw. 4, bzw. 6 Minuten) entfärbende Milch mit Colostrum bzw. Wasser verdünnt ist, desto längere Zeit die Entfärbung in Anspruch nimmt. Ebenso wie man durch Zusatz von größeren Mengen der Formalin-Methylenblau-Lösung zu einer die Schardinger-Reaktion liefernden Milch das Enzym erschöpfen kann, ebenso kann man durch eine weitgehende Verdünnung dieser Milch mit Colostrum oder Wasser die Reaktion hinauszögern oder ganz aufheben. Zur Entfärbung eines gewissen Quantums der F. M.-Lösung braucht man eben ein entsprechendes Quantum Enzym.

Auf Grund der eben besprochenen Versuche dürfen wir wohl den Satz aufstellen, daß das Schardinger-Enzym in gesunder Milch stets, zuweilen (in Milch von „frischmilchenden" Kühen) allerdings nur in Spuren, vorhanden ist. Bezüglich des Fermentgehalts der Milch von „altmilchenden" und „frischmilchenden" Kühen bestehen demnach nur quantitative Unterschiede.

Gleichzeitig dürfen wir aus den obigen Versuchen schließen, daß in der Milch „frischmilchender" Kühe kein „Reduktasebekämpfer", kein „Antiferment" vorhanden ist; andernfalls müßte in „frischmilchender" Milch die Entfärbung unter allen Umständen ausbleiben, bzw. müßte Milch + Colostrum langsamer entfärben als dieselbe Milch + Wasser.

II. Milch von altmilchenden Kühen.

Wir haben oben schon erwähnt, daß Koning (l. c. S. 86) und Schern (l. c. S. 283) für frische Milch von gesunden, „altmilchenden" Kühen als Norm bezeichnet haben, daß 10 ccm solcher Milch bei Zusatz von 1 ccm F. M. im Wasserbad von 45° innerhalb längstens 12 Minuten entfärbt werden. Einerseits um die Richtigkeit dieser Angabe nachzuprüfen, andrerseits um gewissen Eigentümlichkeiten der Schardinger-Reaktion, auf die wir unten noch zu sprechen kommen werden, nachzugehen, haben wir auch eine Anzahl von Milchproben von nachweisbar altmilchenden, gesunden Kühen untersucht. Wir geben das Resultat eines Teiles dieser Untersuchungen in nachstehender Tabelle bekannt.

Tabelle II.

Nähere Bezeichnung	Letzte Geburt ist erfolgt vor Tagen:	Die Untersuchung der Milch wurde vorgenommen in Stunden nach Entnahme: 1/4—1	3	5	7	22	24	Bemerkungen
		Die Reduktionszeit beträgt						
Kuh Nr. 95	112	6′	9′	10′	10′			
„	123	5′		6′	5½′	5′		
„	127	6½′		6½′	2½′ [1]	5½′	1½′ [1]	
Kuh Nr. 91	129	4½′	5′	5′	4½′			
„	140	4½′		5′	5′		4½′	
„	144	6′			5½′	5½′	2′ [1]	
Kuh Nr. 94	117	5½′	7′	8′	7′			
„	128	5′		5½′	5½′	5′		
„	132	5′		5′	2½′ [1]	4½′	2′ [1]	
Kuh Nr. 116	82	11′			9′		9′	
„	86	13′		13′	12½′		12′	
„	93	9½′ (2½′ [1])			9′	6½′	1¾′ [1]	
Kuh Nr. 135	28	10′			10′		10′	Kalb saugt 28 Tage
„	33	15′		16′	17′	14′		
„	40	6′ (3½′ [1])		6′	7′	5½′		
Kuh Nr. 110	96		5′		3½′		3½′	
„	100		5′		6′		5′ 1½′ [1]	
„	105		5½′ (2½′ [1])		7′		5′ 2½′ [1]	
Kuh Nr. 109	100		6½′		5½′		4′	
„	104		5′		5′		4′ 1½′ [1]	
„	109		7′ (2½′ [1])	8′	6′		3′ 1½′ [1]	
Kuh Nr. 76	200	7′			5½′		5′	
„	209	5′ (2½′ [1])		6′	6′	3½′	1½′ [1]	
„	222	6′ (2½′ [1])		4′	5½′	6′		
Kuh Nr. 128	61	10′		7½′	7½′	6′		
„	70	13½′ (— [2]) [1]		20′	27′	12′	4′ [1]	
„	79	8′ (4′ [1])		9′ 5′ [1]	9′		15′ [3]	
Kuh Nr. 111	103	11½′		9′	10′	8′		
„	107	7′		8′	3′ [1]	8′	3′ [1]	
„	112	7½′ (3′ [1])	10′	9½′		7′	3′ [1]	

[1]) Bei 65°.
[2]) Nach 3 Stunden ist nur das untere Drittel entfärbt.
[3]) Milch geronnen.

Auf Grund vorstehender Untersuchungen können wir die Richtigkeit des eingangs dieses Abschnittes angeführten Satzes von Koning und Schern, im allgemeinen wenigstens, bestätigen. Nur bei Kuh Nr. 116, 2. Untersuchung, bei Kuh Nr. 135, 2. Untersuchung, und bei Kuh Nr. 128, 2. Untersuchung, haben sich geringe Abweichungen ergeben. Daß übrigens hie und da bei „altmilchenden" Kühen zum Teil erhebliche Abweichungen von der Norm, Verzögerungen des Eintritts und selbst Ausbleiben der Reaktion vorkommen, haben wir schon oben auf S. 306 u. 307 bemerkt. Weiterhin sind wir im Laufe unserer Untersuchungen auf nicht wenige Milchen von nachweisbar „altmilchenden", gesunden Kühen gestoßen, die die Schardinger-Reaktion nicht innerhalb der geforderten Zeit gegeben haben. Diese Abweichungen von dem oben als Norm angesprochenen Verhalten der Milch „altmilchender" Kühe sind immerhin so zahlreich, daß wir hier besonders hervorheben möchten, daß die obige Behauptung Konings und Scherns nicht für alle Fälle und nicht unter allen Umständen zutrifft.

Ein Umstand allerdings ist dabei sehr zu beachten — und auf diesen können vielleicht manchmal Fälle der eben beschriebenen Art zurückgeführt werden — nämlich die Tatsache, daß der Zeitpunkt der Milchentnahme, d. h. die Länge der Zeit, die zwischen dem letzten Melken und der Probemilchentnahme verstrichen ist, von sehr wesentlichem Einfluß auf den Enzymgehalt der betreffenden Milch ist. Wir haben oben schon, wo wir das Verhältnis zwischen Fettgehalt und Enzymgehalt durch fraktioniertes Melken geprüft haben, feststellen können, daß Restmilch rascher entfärbt als Mittel- und Anfangsmilch. Wir haben diese Frage weiter verfolgt; wir haben zu diesem Zwecke zur üblichen Melkzeit (morgens und abends), nachdem also seit dem letzten Melken etwa 12 Stunden verflossen waren, den betreffenden Kühen zuerst 150 ccm Milch entnommen, hierauf das Euter bis auf etwa 200 ccm ausmelken lassen, diese letzten 200 ccm, ebenso wie die beiden ersten Proben, in einem besonderen Gefäß aufgefangen und nun jede Probe für sich auf ihren Enzymgehalt geprüft. Es hat sich dabei gezeigt, daß die ersten 150 ccm Milch das Reagens öfters nicht in der geforderten Zeit entfärbt haben, daß der Ablauf der Reaktion verzögert gewesen ist, während die beiden andern Proben die Reaktion

innerhalb 10 bis 12 Minuten gegeben haben. Die zuletzt gewonnenen 200 ccm entfärbten dabei regelmäßig früher als die mittlere und die erste Milchprobe.

Um sich vor Irrtümern zu bewahren, ist es deshalb notwendig, diese Verhältnisse zu berücksichtigen und bei der Milchentnahme sich darüber zu vergewissern, wann das letzte Melken stattgefunden hat. Denn wenn wir kurze Zeit nach dem üblichen Melken die Probe entnehmen, so erhalten wir die rasch und fast bei allen Kühen, auch bei den „frischmilchenden", entfärbende Restmilch; und wenn zwischen Melken und Probeentnahme lange Zeit verstrichen ist und wenn wir nur unsere Probe dem Euter entziehen, erhalten wir Anfangsmilch, die unter Umständen nur Spuren Enzym enthält und bei der in üblicher Weise angestellten Schardinger-Probe eine verzögerte Reaktion oder selbst ein negatives Resultat liefert, obwohl das Gesamtgemelke vielleicht entfärbt.

Auch darauf müssen wir hinweisen, daß die einzelnen Euterviertel einer und derselben Kuh — worauf übrigens auch schon Schern aufmerksam gemacht hat — Milch von verschiedenem Enzymgehalt liefern können; es ist deshalb, wenn nicht gerade aus besonderen Gründen die Milch eines einzelnen Viertels untersucht werden soll, angezeigt, die Mischmilch aus sämtlichen vier Vierteln zur Anstellung des Versuchs zu verwenden.

Auf was ist nun wohl die Tatsache zurückzuführen, daß in Restmilch mehr Enzym vorhanden ist als in Anfangsmilch? Mit dem höheren Fettgehalt der Restmilch ist der größere Enzymgehalt, wie wir oben schon ausgeführt haben, nicht in direkten Zusammenhang zu bringen. Das Saugen des Kalbes oder das Melken übt wohl einen funktionellen Reiz auf das Organ aus. Inwieweit aber mit der dadurch bewirkten Erhöhung der sekretorischen Tätigkeit der Drüsenzellen und der Steigerung der Stoffwechselvorgänge im Euter auch die Enzymproduktion beeinflußt wird, entzieht sich unserer Kenntnis.

Nach diesen Ausführungen dürfte es nunmehr an der Zeit sein, an die Beantwortung der Frage heranzugehen, wodurch die Entfärbung des F. M. herbeigeführt wird. Wir haben den die Entfärbung bewirkenden Körper bis jetzt als Schardinger-Enzym bezeichnet, ohne die Berechtigung hierzu näher zu begründen.

Schardinger selbst war geneigt, die Entfärbung des F. M. auf das Reduktionsvermögen von H_2S, der seiner Meinung nach immer in roher Milch vorhanden ist, zurückzuführen. Utz konnte jedoch H_2S in frischer Milch nicht nachweisen, und die von Koning in dieser Richtung angestellten Versuche sprechen ebenfalls gegen obige Annahme; letzterer hat nachgewiesen, daß Methylenblau weder durch Formalin, noch durch eine neutrale Formalin-Milchzuckerlösung, und ebensowenig durch H_2S, NaOH oder Kalkmilch entfärbt wird. Utz und Smidt wollten den Milchzucker als reduzierendes Agens beschuldigen, doch konnte nachgewiesen werden, daß Milchzucker nur in alkalischen Lösungen F. M. entfärbt, während doch letzteres auch durch neutral bzw. amphoter und sauer reagierende Milch entfärbt wird. Sommerfeld war der Ansicht, daß das Reduktionsvermögen der Milch gegenüber von F. M. bakterieller Herkunft ist, und Seligmann ist heute noch der entschiedenste Vertreter dieser Ansicht. Tatsächlich gibt es ja, wie Koning u. a. nachgewiesen haben, zahlreiche Bakterien, die in der Milch vorkommen und Stoffe produzieren, durch die F. M. entfärbt wird. Trommsdorff hat durch Versuche mit steriler Milch nachgewiesen, daß bei dieser die Entfärbung des F. M. ebenso rasch eintritt; er ist der Ansicht, daß die Entfärbung auf die Wirkung eines Enzyms zurückzuführen ist, das in der Milch präformiert ist.

Bei unseren zahlreichen Milchuntersuchungen hat sich gezeigt, daß die Schardinger-Reaktion bei Milch, die unmittelbar nach der Entnahme aus dem Euter untersucht worden ist, in vielen Fällen positiv ausfällt; in der kurzen Zeit zwischen Entnahme und Untersuchung konnte sich ein Einfluß von Bakterien nicht geltend machen, zumal da die ersten 4 bis 5 bakterienhaltigen Strahlen stets beiseite gemolken wurden und die Milch immer in sterilen Gläsern aufgefangen wurde. Wären Bakterien bei der Produktion des Schardinger-Enzyms in frischer Milch beteiligt, so müßten wir die Reaktion jederzeit auch in Milch von „frischmilchenden" Kühen erhalten; denn diese ist ebenso bakterienhaltig wie andere. Ferner müßte Anfangsmilch rascher entfärben als Mittel- und Restmilch, denn die Anfangsmilch enthält die meisten Bakterien; die Milchproben verhalten sich aber gerade umgekehrt. Außerdem haben wir auch nicht wenige steril gewonnenen Milchproben untersucht und prompte positive Reaktionen erhalten.

Aus diesen Versuchen und Beobachtungen geht unbestreitbar hervor, daß der die Reaktion auslösende Körper ein Enzym ist und daß dieses in der Milch präformiert vorhanden ist. Derselben Ansicht sind auch Smidt, Brand,

Jensen, Oppenheimer, Trommsdorff, Koning und Schern. Die Produktion des Enzyms ist wohl als eine besondere Leistung der Euterdrüsenzellen anzusehen.

Daß es sich tatsächlich um ein Enzym oder um einen enzymartigen Körper handelt, geht daraus hervor, daß das wirksame Agens ähnliche Eigenschaften aufweist, wie wir sie den Enzymen als eigentümlich zusprechen. Es möge hier nur an die Empfindlichkeit gegenüber von Cyanwasserstoff, von konservierenden und desinfizierenden Substanzen, insbesondere auch von erheblicheren Zusätzen von Formalin, und ferner an das Verhalten gegenüber von höheren Temperaturen erinnert sein; in letzter Beziehung sei erwähnt, daß das Schardinger-Enzym bei Temperaturen von über 65° allmählich unwirksam und, wie Schardinger, Smidt, Rullmann[1]) und Koning nachgewiesen haben, bei Temperaturen von gegen 70° und darüber zerstört wird. Es empfiehlt sich daher, jedenfalls keine höheren Temperaturen als 65° anzuwenden.

Wir möchten hieran anschließend gleich eine Beobachtung mitteilen, die auch von Koning und Schern gemacht wurde, nämlich daß die optimale Temperatur für das Eintreten der Reaktion bei Milch von altmilchenden Kühen bei 65°, bei der von frischmilchenden Kühen bei 45° liegt. Wendet man die Temperaturen je umgekehrt an, so tritt eine Verzögerung der Entfärbung ein.

Auf eine schon bei der Untersuchung der Milch der „frischmilchenden" Kühe und nun auch bei der der Milch der „altmilchenden" Kühe beobachtete Erscheinung müssen wir aufmerksam machen. Aus Tabelle II und aus den weiter vorn abgedruckten Tabellen ist zu entnehmen, daß Milch unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Euter die Schardinger-Reaktion gibt, ja daß in einzelnen Fällen die unmittelbar nach ihrer Gewinnung untersuchte Milch etwas rascher entfärbt als ältere, die einige Stunden gestanden hat. Auch Schardinger, Utz, Trommsdorff und Koning konnten beobachten, daß Milch, die einige Stunden gestanden hat, nicht selten eine etwas längere Reaktionszeit in Anspruch nahm als ganz frische Milch. Wir konnten diese Erscheinung zuweilen nicht nur bei durch gewöhnliches Melken gewonnener, sondern auch bei steril ent-

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1904, 81.

nommener Milch wahrnehmen und weiterhin feststellen, daß die entfärbende Kraft der Milch etwa gegen die siebente Stunde nach Entnahme abnahm, um von da an wieder anzusteigen, so daß die Milch nach 24 Stunden meist rascher entfärbte als die unmittelbar nach der Gewinnung untersuchte Milch.

Die Ursache des zuweilen beobachteten anfänglichen Zurückgehens der entfärbenden Kraft der Milch konnten wir nicht eruieren. Von einer schädigenden Einwirkung von in der Milch enthaltenen Bakterien auf das Schardinger-Enzym kann nicht wohl die Rede sein, denn die gleiche Erscheinung konnten wir auch in einigen Fällen in steriler Milch beobachten. Daß die Erscheinung mit dem CO_2-Gehalt frischer Milch und mit dem Entweichen der Kohlensäure beim Stehen der Milch — wie Koning meint — in Zusammenhang zu bringen ist, müssen wir bezweifeln, insbesondere mit Rücksicht auf die Ergebnisse unserer Versuche mit steriler Milch auf S. 318, wo sich die Milch nach mehrstündigem Aufbewahren sogar etwas rascher entfärbt hat.

Wir haben oben erwähnt, daß die reduzierende Kraft der Milch Formalin-Methylenblau gegenüber etwa von der 7. Stunde nach der Entnahme an zunimmt, und müssen noch hinzufügen, daß die Milch von dieser Zeit an auch gewöhnliche alkoholische Methylenblaulösung zu entfärben imstande ist. Es hat sich also in dieser Zeit in der Milch ein Körper gebildet, der die Schardinger-Reaktion unterstützt und auch alkoholische Methylenblaulösung entfärbt. Zweifellos ist die Entstehung dieses Körpers auf Bakterien zurückzuführen. Denn gerade zu der oben erwähnten Zeit ungefähr pflegt die bactericide Phase der Milch abgelaufen zu sein, und es kommt nun zu einer massenhaften Vermehrung der in der Milch enthaltenen Bakterien.

Daß in der postbactericiden Phase der Milch tatsächlich die Bakterien es sind, die den reduzierenden Körper liefern, geht daraus hervor, daß pasteurisierte Milch, in der wohl das Schardinger-Enzym, aber nicht alle Sporen der Bakterien vernichtet sind, nach einiger Zeit die Fähigkeit, zu reduzieren, wieder annehmen kann; ferner auch daraus, daß die Reduktionskraft der Milch im allgemeinen mit zunehmender Bakterienzahl steigt, daß diese Fähigkeit durch Kochen verschwindet, aber nach Impfung der gekochten Milch mit geeigneten Bakterien oder mit bakterienhaltiger Milch wieder auftreten kann. Da

das Schardinger-Enzym selbst durch Erhitzen auf über 70° vernichtet wird, so können nur die Bakterien es sein, die der pasteurisierten bzw. gekochten Milch die Fähigkeit, zu entfärben, wieder verleihen.

In steril gewonnener und steril gehaltener Milch tritt eine Zunahme der Reduktionskraft nicht ein, wie wir durch folgende Versuche nachgewiesen haben: Wir haben in einer Anzahl steriler Erlenmeyer-Kölbchen unter aseptischen Kautelen gleichzeitig aus einem und demselben Euter Milch gewonnen und jeweils das erste Kölbchen sofort nach der Entnahme der Milch, das zweite nach 4stündigem, das dritte nach 7stündigem und das vierte nach 22stündigem Stehen auf die Reduktionsfähigkeit der betreffenden Milch untersucht. Gleichzeitig haben wir, um jedem Einwand vorzubeugen, bei den zwei ad hoc angestellten Versuchen von jeder einzelnen Milchprobe den Keimgehalt durch Plattenverfahren und Zählung bestimmt. Es sind zwei (I u. II) gesunde, sicher „altmilchende" Kühe zur Verwendung gekommen. Die Einzelheiten sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle III.

Kölbchen Nr.	Zeit der Untersuchung nach Entnahme	Reaktionszeit		Keime pro Kubikzentimeter Milch	
		I	II	I	II
1	sofort	17½′	6½′	46	0
2	nach 4 Std.	16′	6½′	12	0
3	nach 7 Std.	15′	7′	16	0
4	nach 22 Std.	17′	6½′	24	0

Wir ersehen aus obiger Tabelle, daß die Milch teils vollständig keimfrei war, teils nur wenige Bakterien enthielt, so wenige, daß sie unsern Versuch in keiner Weise beeinflussen konnten. Ein Vergleich der Reduktionszeiten der einzelnen Milchproben von Kuh I und II je unter sich zeigt, daß keine wesentlichen Zeitunterschiede bestehen und daß namentlich die Milchproben, die nach 22stündigem Stehen untersucht worden sind, sich nicht früher entfärbt haben als die sofort nach der Entnahme aus dem Euter untersuchten; ein Ansteigen der Reduktase und eine Beschleunigung der Entfärbung ist deshalb nicht eingetreten, weil eben keine oder nicht genügend viele Bakterien vorhanden gewesen sind, die reduzierende Substanzen hätten produzieren können.

Aus diesen Untersuchungen entnehmen wir, daß in der Milch zwei Körper vorhanden sein können, die dieselbe Eigenschaft, Formalin-Methylenblau zu entfärben, besitzen. Diese beiden Körper brauchen aber deswegen nicht identisch zu sein, sie üben wohl denselben Effekt aus, sind aber ihrem Wesen und ihrer Herkunft nach total verschieden: der eine ist ein in der Milch präformiertes, lösliches Enzym, ein spezifisches Produkt der Euterdrüsenzellen, steht mit der Bakterienflora der Milch in keinerlei Beziehung und entfärbt nur F. M.; der andere verdankt seine Entstehung Bakterien, ist ein Bakterienenzym, ein Ferment, an das Dasein lebenden Protoplasmas geknüpft und entfärbt außer F. M. gewöhnlich auch alkoholische Methylenblaulösung.

Aus vorstehenden Ausführungen ergeben sich folgende

Schlußfolgerungen.

I.

1. Das Thermodiaskop von Schern erleichtert die Ausführung der Schardingerschen Probe.

2. Das Abmessen der Flüssigkeiten mittels Pipetten ist der Benutzung der von Schern empfohlenen, graduierten Reagensgläschen, weil genauer, vorzuziehen.

3. Unmittelbar nach der Geburt und nicht selten auch noch in den nächstfolgenden Tagen gibt Kuhmilch (Colostralmilch) die Schardingersche Reaktion, wenn auch zuweilen verzögert.

4. In der Milch „frischmilchender" Kühe bleibt die Reaktion in der Regel aus und zeigt sich in den meisten Fällen erst nach Verlauf von 3 bis 8 Wochen post partum wieder.

5. Die Zeit des Wiedereintritts der Reaktion nach der Geburt ist großen Schwankungen unterworfen, deren Ursachen nicht immer feststellbar sind.

6. Das Saugen des Kalbes ist von keinem Einfluß auf die Zeit des Wiedereintritts der Reaktion nach der Geburt.

7. Allgemeinerkrankungen und Entzündungen des Euters beeinflussen die Schardinger-Reaktion.

8. Der Enzym- (Reduktase-) Gehalt der Milch ist nicht von dem Fettgehalt abhängig.

9. Das Schardinger-Enzym wird im Rahm und in der Restmilch angereichert angetroffen.

10. Das Enzym fehlt nie ganz, auch nicht in der Milch frischmilchender Kühe, was daraus hervorgeht, daß sich im Rahm bzw. in der Restmilch stets wenigstens Spuren des Enzyms nachweisen lassen und daß Mich + Colostralmilch rascher entfärbt als dieselbe Milch + Wasser.

11. In der Milch frischmilchender Kühe ist kein „Reduktasebekämpfer" (Antiferment) enthalten.

12. Zwischen dem Enzymgehalt „altmilchender" und „frischmilchender" Kühe bestehen nur quantitative Unterschiede.

13. Zur Entfärbung eines gewissen Quantums der F. M.-Lösung braucht man ein entsprechendes Quantum Reduktase.

II.

14. 10 ccm Milch von gesunden „altmilchenden" Kühen entfärben 1 ccm F. M. in der Regel innerhalb 4 bis 12 Minuten. Abweichungen von dieser Regel kommen öfters vor.

15. Die Zeit, die zwischen dem letzten Melken und der Entnahme einer Milch verflossen ist, ist von Einfluß auf den Enzymgehalt dieser Milch.

16. Beim fraktionierten Melken enthält die Anfangsmilch wenig, die Mittelmilch mehr und die Restmilch am meisten Reduktase.

17. Die einzelnen Euterviertel einer und derselben Kuh können Milch von verschiedenem Reduktasegehalt liefern.

18. Steril entnommene Milch entfärbt gerade so, wie die durch das übliche Melken gewonnene.

19. Der die Entfärbung bewirkende Körper ist ein in der Milch präformiert vorhandenes Enzym.

20. Temperaturen von über 65° machen das Enzym unwirksam.

21. Die optimale Reaktionstemperatur ist für Milch „altmilchender" Kühe bei 65°, für die „frischmilchender" Kühe bei 45°.

22. In bakterienhaltiger Milch tritt nach Ablauf der bactericiden Phase eine Zunahme der Reduktionskraft ein, in steriler Milch nicht. Die Zunahme ist auf fermentproduzierende Bakterien zurückzuführen.

Das Verhalten des Fettes tierischer Organe bei antiseptischer Aufbewahrung.

Von

Nagamichi Shibata.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 29. Januar 1911.)

Wenn von Tieren getrennte Gewebe oder Organe vor Fäulnis geschützt bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, so unterliegen dieselben dem Prozesse einer langsam verlaufenden Autolyse. Das mikroskopische Bild solcher Organe entspricht demjenigen bei der sogenannten fettigen Degeneration der Pathologen. Färbt man mikroskopische Präparate derselben mittels Flemmigscher Lösung oder Sudan III, so nehmen die gefärbten Fettkügelchen mit der Dauer der Autolyse bedeutend an Menge zu. Dieses Verhalten hat früher A. Sata[1]) eingehend verfolgt.

Sata hat frisch geschnittene Stücke von Leber, Niere und Herz von Menschen und getöteten Tieren (Meerschweinchen, Hunden und Katzen) teils einfach in Wasser gelegt, teils mit Sublimat — Carbolwasser oder Alkohol — gut gewaschen und dann möglichst steril aufbewahrt. Sowohl in den in Fäulnis begriffenen als auch in den bis zuletzt ganz steril gebliebenen Lebern und Nieren trat eine deutliche Vermehrung der gefärbten Fettkügelchen nach 5 Tagen auf und erreichte nach 25 Tagen

[1]) A. Sata, Über die postmortale Fettbildung der tierischen Gewebe. Mitteilungen der Med. Ges. zu Tokio 16, H. 19, 1902.

ihr Maximum. Hieraus glaubte Sata den Schluß ziehen zu dürfen, daß sich das Protoplasmaeiweiß der Organe nach dem Tode der Tiere z. T. in Fett umwandelt, und somit die alte Virchowsche Lehre von der Fettneubildung aus dem Protoplasmaeiweiß bei fettiger Degeneration innerer Organe von neuem bestätigt zu haben.

Diese Schlußfolgerung von Sata ist indessen durchaus nicht begründet; denn in tierischen Geweben und Organen kommen bekanntlich außer Neutralfett eine ganze Anzahl solcher Verbindungen vor, die im Molekül Fettsäureradikale enthalten, wie Lecithin, Jecorin, Protagon, Cerebrin, Seifen, Fettsäurecholesterinester usw. Die Zunahme der färbbaren Fettkügelchen im Laufe der Autolyse (gleichbedeutend mit der Dauer der antiseptischen Aufbewahrung der Organe) kann auf verschiedene Weisen zustande kommen, indem die anfänglich nicht sichtbaren Lipoide infolge der autolytischen Mazerationen sich in färbbare Formen umwandeln. Waldvogel behauptet, daß sich bei der Autolyse die Menge der übrigen Lipoide auf Kosten des „Lecithins" vermehre. Derselbe nimmt auch an, daß die Gesamtmenge des Fettes sich bei der Autolyse vermehrt.

Vor kurzem hat K. Ohta[1]) über dasselbe Thema eine Abhandlung publiziert und die vorliegenden Angaben kritisch erörtert. Ohta selbst gelangte bei seinen Untersuchungen zu dem Resultate, daß die Gesamtmenge der hochmolekularen Fettsäuren bei der Autolyse und antiseptischer Aufbewahrung der Leber weder zu- noch abnimmt, also ganz unverändert bleibt. Wie Ohta mit Recht hervorhebt, kann die wirkliche Fettneubildung aus anderen Verbindungen in den Organen nur dann mit voller Sicherheit als erwiesen erachtet werden, wenn in der Tat eine Vermehrung der Gesamtmenge hochmolekularer Fettsäuren sicher zu konstatieren wäre. Eine bloße Vermehrung des Ätherextrakts oder Alkohol- resp. Chloroformätherextrakts allein hat dagegen mit der wahren Fettvermehrung nichts zu tun. Da man leider bis vor kurzem Ätherextrakte allerlei Herkunft ganz einfach als „Fett" betrachtet hat, so war die Entwirrung der Fettbildungsfragen bis jetzt ganz unmöglich. Da Ohta in dieser Hinsicht mit der einwandfreien Fettbestimmungsmethode von Kumagawa-Suto gearbeitet hat und demgemäß gegen den von ihm gezogenen Schluß nichts einzuwenden ist, so habe ich doch dieses Thema von neuem

---

[1]) Über das Verhalten des Organfettes bei der Autolyse und antiseptischem Aufbewahren. Diese Zeitschr. 29, 1, 1910.

in Angriff genommen, weil zur definitiven Entscheidung einer biologisch so bedeutsamen Frage wie der Fettbildung aus Eiweiß im Tierkörper erneute Nachprüfungen doch wünschenswert erscheinen, um so mehr, da Ohta doch nur mit Pferdelebern sichere Resultate zu verzeichnen hatte.

Ohta hat durch zahlreiche Einzelbestimmungen von einem Pferdeleberbrei den Fettgehalt während der Autolyse bis zu 30 Tagen verfolgt. Bei einer zweiten Pferdeleber hat Ohta in Parallelversuchen die Autolyse bei 37 bis 40° C unter antiseptischer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sogar 100 Tage beobachtet. Dabei betrug die Differenz des Leberfettes in den Einzelbestimmungen während 100 Tagen höchstens 3%. Die weitaus meisten Zahlen stimmten noch viel genauer überein. Dagegen haben die Autolysen einer Rindsherzmuskulatur, die 30 Tage lang untersucht worden war, wenig zufriedenstellende Resultate ergeben. Die Schwankungen der Fettzahlen betrugen hier um ± 10%. Ohta führt diesen Befund darauf zurück, daß die Mischung des Muskelbreis wegen der eigenartigen Struktur des Organs möglicherweise nicht ganz gleichmäßig gewesen sei. Ohta hat somit nur zwei Pferdelebern und ein Rinderherz untersucht, obwohl bei der zweiten Leber seine Beobachtungszeit sich auf 100 Tage ausdehnte.

Ich habe im folgenden 5 Lebern, 7 Nieren und 1 Oberschenkelmuskel von 2 Kaninchen, 1 Hund, 1 Katze und 5 Menschen untersucht. Im ganzen habe ich je 90 Fett- und Cholesterinbestimmungen ausgeführt. Ferner habe ich außer den Fettbestimmungen in jeder Serie mikroskopische Präparate mit Osmiumsäure und Sudan III gefärbt. Allerdings erstreckte sich meine längste Beobachtungszeit nur auf 46 Tage. Da Ohta in seinen Parallelversuchen gezeigt hat, daß der Fettgehalt sich bei Autolyse und antiseptischer Aufbewahrung ganz gleichmäßig verhielt, so habe ich in allen folgenden Versuchen antiseptische Aufbewahrung allein angewendet.

Versuchsanordnungen.

Frische, wasserhaltige Organe absolut keimfrei beliebig lange Zeit aufzubewahren, ist eine äußerst schwierige Aufgabe, wie dies auch Sata ganz besonders betonte. Sata konnte die mit Sublimat, Carbolwasser oder Alkohol gut ausgewaschenen Organe in seiner 25tägigen Versuchsdauer nur zweimal ganz steril erhalten. Gerade die Leber ist dasjenige Organ, das sich schwer keimfrei aufbewahren läßt.

Deshalb habe ich bei Leber und Nieren besondere Voroperationen angestellt. Diese Organe wurden im Zusammenhang mit möglichst langen Hauptgefäßen unversehrt aus den Körpern herausgenommen und bei den

Lebern von der Pfortader und bei den Nieren von den zuführenden Gefäßen aus mit sterilem Kochsalzwasser (1%) unter gewissem Druck ausgespült, bis das Abflußwasser beinahe farblos herausfloß. Alsdann wurde das Spülwasser durch chloroformgesättigtes Kochsalzwasser ersetzt und die Ausspülung weiter fortgesetzt, bis die Flüssigkeit nunmehr ganz farblos abfloß. Von den so gereinigten Lebern wurden Stücke aus möglichst gefäßfreien Teilen herausgeschnitten.

Von den Nieren wurden Rindenteile nach Kapselabziehung herausgeschnitten. Dieselben wurden in die vorher tarierten kleinen Doppelschalen hineingebracht und gewogen. In jede Schale wurde vorher eine Schicht Gaze gelegt, die mit Chloroformwasser gut durchtränkt wurde. Nachdem je ein Organstück auf die Gaze aufgelegt und mitsamt dem Deckel abgewogen worden war, wurde eine passende Menge Kochsalzchloroformwasser darüber gegossen, so daß das Organstück ganz in die Flüssigkeit tauchte. Außerdem wurde noch ein ganz kleines Organstückchen extra hinzugelegt, das zur mikroskopischen Fettfärbung diente. Mehrere solcher mit Organstückchen beschickter, für sich geschlossene Schälchen sind nun in einer großen Petrischale, die im Boden etwas Chloroform enthält, geschlossen aufbewahrt worden, so daß alle Organstückchen dauernd in mit Chloroform gesättigtem Kochsalzwasser verweilten. Impfversuche auf Agarnährboden, die vor jeder Fettbestimmung angestellt worden sind, waren ein Zeugnis dafür, daß alle Proben ohne Ausnahme vollkommen steril blieben.

Alle Fettbestimmungen geschahen selbstverständlich nach der Verseifungsmethode von Kumagawa-Suto. Hierzu wurden Organstücke herausgenommen und im Becherglas genau nach der Vorschrift durch Laugenzusatz verseift. Anfänglich muß man bei der Verseifung die Mischung vorsichtig umrühren, bis das Chloroform vollkommen entwichen ist. Sonst tritt leicht unangenehmes Schäumen auf. Die untergelegte Gaze wurde für sich mit kochendem Alkohol vollkommen extrahiert und der Alkoholrückstand, sowie derjenige des Chloroformkochsalzwassers nach dem Verdunsten mit der Hauptmasse zusammen verseift.

Zur Fettfärbung habe ich Grüblersche Präparate von Osmiumsäure und Sudan III benutzt. Zur Auflösung von Sudan III wird in der Regel Alkohol vorgeschlagen. Um die fettlösende Wirkung desselben zu vermeiden, habe ich vergeblich versucht, durch Zusatz von Säure oder Alkali den Gehalt des Alkohols möglichst herabzusetzen. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die schwächste Konzentration desselben, die noch gute Fettfärbung bewirkt, 70%ig war. Deshalb habe ich bei meinen Untersuchungen diese Konzentration des Alkohols ohne Säure- resp. Alkalizusatz beibehalten. Es ist kaum nötig zu erwähnen, daß alle erforderlichen Reagenzien, wie Alkohol, Äthyläther, Petroläther usw. vor dem Gebrauch durch Destillation gereinigt worden sind. Die Gaze wurde vorher durch gründliche Alkoholextraktion von Spuren von Lipoiden befreit. Alle sonstigen Einzeldaten sind in den Tabellen verzeichnet.

Tabelle Ia.

Material von Kaninchen I. — Körpergewicht 1,95 kg.
Untersuchung am 12. März 1910 begonnen.

1. Oberschenkelmuskel.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	4,120		0,0297	0,7209	0,0217	0,5267	0,0080	0,1942
	2	9,068		0,0613	0,6761	0,0443	0,4926	0,0170	0,1875
Mittel		6,594		0,0455	0,6985	0,0330	0,5097	0,0125	0,1909
Eigentliche Probe	1	5,447	7	0,0384	0,7049	0,0280	0,5158	0,0103	0,1891
	2	5,505	7	0,0390	0,7084	0,0285	0,5177	0,0105	0,1907
Mittel		5,476	7	0,0387	0,7066	0,0283	0,5167	0,0104	0,1899
2. Leber.									
Kontroll-probe	1	4,342		0,0866	1,995	0,0694	1,598	0,0172	0,3961
	2	5,891		0,1164	1,976	0,0931	1,580	0,0233	0,3956
Mittel		5,117		0,1015	1,986	0,0813	1,589	0,0203	0,3959
Eigentliche Probe	1	4,362	7	0,0860	1,972	0,0686	1,573	0,0174	0,3988
	2	8,200	7	0,1624	1,981	0,1300	1,586	0,0324	0,3951
Mittel		6,281	7	0,1242	1,977	0,0993	1,573	0,0249	0,3970

Tabelle Ib.

Übersichtstabelle von Ia.

Die Zahlen sind Durchschnittswerte; prozentische Differenzen sind in Klammern angegeben.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Oberschenkel-muskel		0,6985 (100)	0,5097 (100)	0,1909 (100)
„	7	0,7103 (101,7)	0,5241 (102,8)	0,1892 (99,13)
Leber		1,986 (100)	1,589 (100)	0,3959 (100)
„	7	1,977 (99,56)	1,573 (98,97)	0,3970 (100,2)

Bei 7tägiger Aufbewahrung sind die prozentischen Differenzen der Petrolätherextrakte sowohl bei Muskel wie bei Leber unter 1% geblieben. Die Werte des Cholesterins stimmten bei der Leber und dem Muskel fast vollkommen überein.

Dagegen war die Menge der Fettsäuren beim Muskel um 2% mehr und bei der Leber um 1% weniger.

Tabelle IIa.

Material von Kaninchen II. Körpergewicht 2,77 kg.
Untersuchung am 26. März 1910 begonnen.

1. Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	6,086		0,1698	2,790	0,1526	2,507	0,0172	0,2826
	2	2,904		0,0836	2,878	0,0738	2,540	0,0098	0,3375
	Mittel	4,495		0,1267	2,835	0,1132	2,524	0,0135	0,3101
Eigentliche Probe	1	7,581	6	0,2202	2,904	0,1970	2,598	0,0236	0,3060
	2	8,890	6	0,2544	2,862	0,2248	2,529	0,0296	0,3330
	Mittel	8,236	6	0,2373	2,883	0,2109	2,563	0,0266	0,3195
Eigentliche Probe	1	7,230	12	0,2057	2,845	0,1776	2,470	0,0271	0,3749
	2	6,390	12	0,1778	2,783	0,1578	2,470	0,0200	0,3130
	Mittel	6,810	12	0,1917	2,814	0,1677	2,470	0,0264	0,3835
Eigentliche Probe	1	6,904	15	0,1933	2,801	0,1694	2,462	0,0234	0,3491
	2	6,128	15	0,1746	2,848	0,1548	2,525	0,0198	0,3390
	Mittel	6,516	15	0,1840	2,825	0,1621	2,494	0,0216	0,3310
				2. Linke Niere.					
Kontroll-probe	1	3,603		0,0936	2,598	0,0736	2,043	0,0200	0,5550
	2	—		—	—	—	—	—	—
	Mittel	3,603		0,0936	2,598	0,0736	2,043	0,0200	0,5550
Eigentliche Probe	1	3,730	42	0,0962	2,579	0,0752	2,016	0,0210	0,5630
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	Mittel	3,730	42	0,0962	2,579	0,0752	2,016	0,0210	0,5630

Tabelle IIb.

Übersichtstabelle von IIa.

Die Zahlen sind Durchschnittswerte; prozentische Differenzen sind in Klammern angegeben.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,835 (100)	2,524 (100)	0,3101 (100)
„	6	2,833 (101,7)	2,563 (101,5)	0,3191 (102,9)
„	12	2,814 (99,24)	2,470 (97,86)	0,3835 (123,7)

Tabelle IIb (Fortsetzung).

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber	15	2,825 (99,63)	2,494 (98,81)	0,3310 (100,3)
Linke Niere		2,598 (100)	2,043 (100)	0,5550 (100)
„ „	42	2,579 (99,15)	2,016 (98,70)	0,5630 (101,4)

Die Petrolätherextrakte stimmen bei Leber in allen Serien mit Kontrollproben sehr gut überein. Die Fettsäuren differieren um einige Prozente. Einer der sonst sehr gut übereinstimmenden Cholesterinwerte hat dagegen eine Abweichung von $+24\%$ gezeigt. Bei der Niere haben alle Werte in 42 Tagen eine Differenz von $\pm 1\%$ erwiesen.

Tabelle IIIa.

Material von einem Hund von 6 kg Körpergewicht.

Untersuchung am 4. April 1910 begonnen.

1. Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	14,130		0,3828	2,710	0,3300	2,336	0,0528	0,3737
	2	18,396		0,4824	2,622	0,4210	2,288	0,0614	0,3337
	Mittel	16,263		0,4326	2,666	0,3755	2,312	0,0571	0,3537
Eigentliche Probe	1	18,02	20	0,4806	2,667	0,4198	2,330	0,0608	0,3374
	2	13,75	20	0,3740	2,720	0,3282	2,388	0,0458	0,3322
	Mittel	15,88	20	0,4273	2,694	0,3740	2,359	0,0533	0,3348
Eigentliche Probe	1	10,360	26	0,2842	2,744	0,2482	2,397	0,0360	0,3475
	2	17,892	26	0,4700	2,638	0,2691	2,296	0,0612	0,3422
	Mittel	14,126	26	0,3771	2,691	0,2389	2,346	0,0486	0,3449
Eigentliche Probe	1	8,901	34	0,2450	2,753	0,2110	2,371	0,0340	0,3820
	2	18,823	34	0,4898	2,602	0,4261	2,2263	0,0637	0,3384
	Mittel	13,862	34	0,3674	2,678	0,3186	2,3590	0,0489	0,3602
Eigentliche Probe	1	18,45	46	0,4820	2,612	0,4180	1,999	0,0640	0,3469
	2	17,339	46	0,4690	2,705	0,4130	2,365	0,0590	0,3403
	Mittel	18,193	46	0,4755	2,668	0,4116	2,324	0,0615	0,3436

Tabelle IIIa (Fortsetzung).

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
2. Rechte Niere.									
Kontroll-probe	1	9,657		0,2746	2,844	0,2278	2,359	0,0468	0,4846
	2	8,276		0,2296	2,774	0,1904	2,300	0,0392	0,4737
Mittel		8,967		0,2521	2,809	0,2091	2,330	0,0430	0,4786
Eigentliche Probe	1	8,1940	45	0,2268	2,768	0,1878	2,292	0,0390	0,4760
	2	9,5134	45	0,2678	2,815	0,2242	2,357	0,0436	0,4583
Mittel		8,8537	45	0,2473	2,792	0,2060	2,325	0,0413	0,4672
3. Linke Niere.									
Kontroll-probe	1	9,718		0,2685	2,755	0,2245	2,302	0,0440	0,4528
	2	9,070		0,2572	2,835	0,2152	2,372	0,0420	0,4630
Mittel		9,394		0,2629	2,795	0,2199	2,337	0,0430	0,4579
Eigentliche Probe	1	10,351	45	0,2882	2,785	0,2400	2,319	0,0482	0,4657
	2	8,927	45	0,2530	0,834	0,2070	0,375	0,0460	0,4593
Mittel		9,639	45	0,2705	2,810	0,2235	2,347	0,0471	0,4625

Tabelle IIIb.

Übersichtstabelle von IIIa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,666 (100)	2,312 (100)	0,3537 (100)
„	20	2,694 (101,3)	2,359 (102,1)	0,3348 (94,62)
„	26	2,691 (100,9)	2,346 (101,5)	0,3449 (97,36)
„	34	2,678 (100,4)	2,319 (100,03)	0,3602 (102,0)
„	46	2,668 (100,1)	2,324 (100,9)	0,3436 (99,4)
Rechte Niere		2,809 (100)	2,330 (100)	0,4786 (100)
„ „	45	2,792 (99,38)	2,325 (102)	0,4672 (97,72)
Linke Niere		2,795 (100)	2,337 (100)	0,4579 (100)
„ „	45	2,810 (100,6)	2,347 (100,5)	0,4625 (101,0)

Die Petrolätherextrakte und Fettsäuren stimmen sowohl bei Leber wie bei Nieren sehr gut überein. Die Cholesterinwerte differieren meist um einige Prozente.

Tabelle IVa.

Material von einer Katze von 3,11 kg Körpergewicht.

Untersuchung am 26. April 1910 begonnen.

Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontrollprobe	1	15,911		0,4290	2,697	0,3528	2,218	0,0762	0,4789
	2	11,152		0,2940	2,637	0,2453	2,200	0,0487	0,4368
Mittel		13,53		0,3615	2,667	0,2990	2,209	0,0629	0,4580
Eigentliche Probe	1	15,664	16	0,4370	2,790	0,3622	2,312	0,0748	0,4776
	2	14,253	16	0,3786	2,657	0,3118	2,188	0,0668	0,4688
Mittel		14,959	16	0,4078	2,724	0,3370	2,250	0,0768	0,4732
Eigentliche Probe	1	7,794	28	0,2080	2,675	0,1649	2,267	0,0318	0,4081
	2	9,575	28	0,2576	2,690	0,2128	2,222	0,0448	0,4679
Mittel		8,645	28	0,2353	2,721	0,1960	2,267	0,0393	0,4545

Tabelle IVb.

Übersichtstabelle von IVa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organes	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,667 (100)	2,209 (100)	0,4580 (100)
„	16	2,724 (102,1)	2,250 (101,81)	0,4732 (103,3)
„	28	2,721 (102,1)	2,267 (102,7)	0,4545 (99,83)

Alle drei Werte stimmen sehr gut überein. Nur die Cholesterinwerte differieren immer noch um einige Prozente.

Tabelle Va.

Material von einer 42jährigen Frau. Todesursache Placenta praevia.
Untersuchung am 12. Mai 1910 begonnen.

Linke Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	6,979		0,1148	1,644	0,0833	1,192	0,3315	0,4513
	2	6,774		0,1164	1,718	0,0865	1,101	0,0299	0,4414
Mittel		6,872		0,1156	1,681	0,0839	1,147	0,3307	0,4469
Eigentliche Probe	1	5,114	7	0,0846	1,655	0,0626	1,244	0,0220	0,4302
	2	5,821	7	0,0954	1,639	0,0665	1,194	0,0279	0,4449
Mittel		5,468	7	0,0900	1,647	0,0646	1,220	0,0250	0,4464
Eigentliche Probe	1	5,118	14	0,0848	1,657	0,0610	1,192	0,0238	0,4650
	2	4,540	14	0,0767	1,690	0,0569	1,254	0,0198	0,4361
Mittel		4,829	14	0,0808	1,674	0,0590	1,223	0,0218	0,4376
Eigentliche Probe	1	4,244	20	0,0745	0,756	0,0557	1,313	0,0188	0,4430
	2	5,523	20	0,0899	1,629	0,0737	1,184	0,0246	0,4454
Mittel		4,884	20	0,0822	1,693	0,0649	1,249	0,0212	0,4442

Tabelle Vb.

Übersichtstabelle von Va.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Linke Niere		1,681 (100)	1,147 (100)	0,4469 (100)
„ „	7	1,647 (97,95)	1,220 (106,3)	0,4464 (99,88)
„ „	14	1,6740 (99,59)	1,223 (106,4)	0,4376 (99,97)
„ „	20	1,693 (100,7)	1,249 (108,9)	0,4442 (99,4)

Die Petrolätherextraktwerte stimmen sehr gut überein. Dagegen zeigen die hochmolekularen Fettsäurenwerte eine weniger gute Übereinstimmung.

Tabelle VIa.

Material von einem 44jährigen Manne. Todesursache: akute Peritonitis. Untersuchung am 12. Mai 1910 begonnen.

Rechte Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hoch-molekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	7,099		0,1224	1,724	0,0928	1,307	0,0296	0,4171
	2	8,905		0,1470	1,651	0,1112	1,249	0,0358	0,4021
Mittel		8,025		0,1347	1,688	0,1020	1,278	0,0327	0,4096
Eigentliche Probe	1	7,325	7	0,1236	1,688	0,0396	1,278	0,0300	0,4096
	2	5,659	7	0,0954	1,686	0,0720	1,273	0,0234	0,4135
Mittel		6,492	7	0,1095	1,687	0,0553	1,276	0,0267	0,4116
Eigentliche Probe	1	6,009	18	0,1000	1,663	0,0756	1,257	0,0244	0,4061
	2	5,252	18	0,0880	1,675	0,0666	1,268	0,0214	0,4074
Mittel		5,631	18	0,0940	1,669	0,0711	1,263	0,0229	0,4068
Eigentliche Probe	1	7,375	24	0,1246	1,696	0,0946	1,289	0,0300	0,4067
	2	7,465	24	0,1302	1,744	0,0996	1,334	0,0306	0,4100
Mittel		7,420	24	0,1274	1,720	0,0971	1,312	0,0303	0,4084
Eigentliche Probe	1	7,909	31	0,1328	1,679	0,1004	1,268	0,0324	0,4222
	2	5,659	31	0,0956	1,690	0,0720	1,273	0,0236	0,4171
Mittel		6,784	31	0,1142	1,685	0,0862	1,271	0,0280	0,4197

Tabelle VIb.

Übersichtstabelle von VIa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hoch-molekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Rechte Niere		1,688 (100)	1,278 (100)	0,4096 (100)
„ „	7	1,687 (99,33)	1,276 (99,84)	0,4116 (100,5)
„ „	18	1,669 (98,81)	1,263 (98,81)	0,4068 (99,33)
„ „	24	1,720 (101,9)	1,312 (102,8)	0,4084 (99,77)
„ „	31	1,685 (99,82)	1,271 (99,42)	0,4197 (103,8)

Alle drei Werte stimmen mit wenigen Ausnahmen ziemlich gut.

Tabelle VIIa.

Material von einem 14jährigen Knaben. Todesursache Pleuritis.
Untersuchung am 18. Mai 1910 begonnen.
Rechte Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	8,523		0,1512	1,774	0,1088	1,277	0,0424	0,4975
	2	8,442		0,1490	1,765	0,1074	1,272	0,0416	0,4928
Mittel		8,483		0,1501	1,770	0,1081	1,275	0,0420	0,4952
Eigentliche Probe	1	9,571	8	0,1688	1,764	0,1224	1,279	0,0464	0,4849
	2	8,036	8	0,1428	1,777	0,1032	1,284	0,0396	0,4928
Mittel		8,803	8	0,1558	1,771	0,1128	1,282	0,0430	0,4889
Eigentliche Probe	1	8,467	14	0,1501	1,772	0,1083	1,278	0,0418	0,4937
	2	7,153	14	0,1268	1,773	0,0914	1,278	0,0354	0,4949
Mittel		7,810	14	0,1385	1,773	0,0999	1,278	0,0386	0,4943
Eigentliche Probe	1	6,921	21	0,1226	1,771	0,0884	1,277	0,0342	0,4941
	2	5,798	21	0,1026	1,769	0,0740	1,276	0,0286	0,4933
Mittel		6,360	21	0,1126	1,770	0,0812	1,278	0,0314	0,4937
Eigentliche Probe	1	6,556	29	0,1166	1,779	0,0838	1,285	0,0328	0,5003
	2	4,566	29	0,0806	1,765	0,0586	1,283	0,0220	0,4817
Mittel		5,561	29	0,0986	1,772	0,0712	1,284	0,0274	0,4910

Tabelle VIIb.

Übersichtstabelle von VIIa.
Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Rechte Niere		1,770 (100)	1,275 (100)	0,4952 (100)
„ „	8	1,771 (100)	1,282 (100,6)	0,4889 (98,72)
„ „	14	1,773 (100,2)	1,278 (100,2)	0,4943 (99,82)
„ „	21	1,770 (100)	1,278 (100,2)	0,4937 (99,68)
„ „	29	1,772 (100,1)	1,284 (100,7)	0,4910 (99,15)

Fast vollständige Übereinstimmung aller drei Werte.

Tabelle VIIIa.

Material von einem 60jährigen Manne. Todesursache Herzfehler.
Untersuchung am 18. Mai begonnen.

Linke Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hoch-molekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	10,401		0,1600	1,538	0,1165	1,120	0,0435	0,4183
	2	7,732		0,1176	1,522	0,0847	1,097	0,0320	0,4255
Mittel		9,072		0,1388	1,530	0,1006	1,109	0,0382	0,4219
Eigentliche Probe	1	8,128	8	0,1245	1,531	0,0897	1,103	0,0348	0,4282
	2	9,372	8	0,1445	1,542	0,1047	1,117	0,0398	0,4247
Mittel		8,750	8	0,1345	1,537	0,0972	1,110	0,0378	0,4264
Eigentliche Probe	1	8,131	14	0,1254	1,542	0,0904	1,112	0,0350	0,4304
	2	8,852	14	0,1360	1,537	0,0990	1,119	0,0370	0,4180
Mittel		8,750	14	0,1307	1,540	0,0947	1,116	0,0360	0,4242
Eigentliche Probe	1	13,963	21	0,2142	1,534	0,1536	1,096	0,0606	0,4341
	2	3,574	21	0,0552	1,544	0,0399	1,116	0,0153	0,4281
Mittel		8,769	21	0,1347	1,539	0,0968	1,106	0,0379	0,4311

Tabelle VIIIb.

Übersichtstabelle von VIIIa.
Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hoch-molekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Linke Niere		1,530 (100)	1,109 (100)	0,4219 (100)
„ „	8	1,537 (100,5)	1,110 (100,1)	0,4264 (101,0)
„ „	14	1,540 (100,7)	1,116 (100,7)	0,4242 (100,6)
„ „	21	1,539 (100,6)	1,106 (99,52)	0,4311 (102,2)

Sehr gute Übereinstimmung aller drei Werte.

Tabelle IXa.

Material von einem 19jährigen Mädchen. Todesursache: Appendicitis. Untersuchung am 21. Juni begonnen.

Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-probe	1	10,59		0,3112	2,939	0,2692	2,542	0,0420	0,3966
	2	12,79		0,3748	2,930	0,3242	2,534	0,0506	0,3957
Mittel		16,69		0,3330	2,935	0,2967	2,538	0,0463	0,3962
Eigentliche Probe	1	5,838	6	0,1718	2,943	0,1482	2,535	0,0232	0,3974
	2	16,031	6	0,4698	2,931	0,4062	2,534	0,0636	0,3968
Mittel		10,935	6	0,3205	2,937	0,2772	2,535	0,0434	0,3971
Eigentliche Probe	1	14,17	13	0,4176	2,947	0,3620	2,555	0,0556	0,3924
	2	15,72	13	0,4608	2,931	0,3944	2,534	0,0624	0,3968
Mittel		14,94	13	0,4287	2,939	0,3782	2,545	0,0590	0,3946
Eigentliche Probe	1	11,72	16	0,3420	2,917	0,2952	2,518	0,0468	0,3992
	2	14,62	16	0,4302	2,943	0,3720	2,545	0,0582	0,3980
Mittel		13,17	16	0,3861	2,930	0,3336	2,532	0,0525	0,3986
Eigentliche Probe	1	11,33	29	0,3342	2,949	0,2896	2,555	0,0446	0,3937
	2	8,114	29	0,2372	2,932	0,2050	2,535	0,0322	0,3969
Mittel		9,722	29	0,2857	2,940	0,2473	2,545	0,0384	0,3953
Eigentliche Probe	1	11,82	37	0,3470	2,935	0,3002	2,540	0,0468	0,3959
	2	12,30	37	0,3620	2,943	0,3133	2,547	0,0487	0,3959
Mittel		12,06	37	0,3545	2,938	0,3068	2,544	0,0478	0,3959

Tabelle IXb.

Übersichtstabelle von IXa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,935 (100)	2,538 (100)	0,3962 (100)
„	6	2,937 (100,1)	2,535 (99,88)	0,3971 (100,2)
„	13	2,939 (100,1)	2,545 (100,2)	0,3946 (99,61)
„	16	2,930 (99,84)	2,532 (99,74)	0,3986 (100,7)

Tabelle IXb (Fortsetzung).

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber	29	240,9 (100,2)	2,545 (100,2)	0,3953 (99,77)
„	37	2,938 (100,1)	2,544 (100,2)	0,3959 (99,97)

Eine fast vollständige Übereinstimmung aller drei Werte.

Schlußbetrachtung.

Wie die einzelnen Daten in den Tabellen ausführlich zeigen, stimmten die Werte der im ganzen je 90 Einzelbestimmungen von Petrolätherextrakten und hochmolekularen Fettsäuren sowohl bei Lebern, Nieren und Muskeln von Menschen und Tieren sehr gut überein, wenn man von einigen stark abweichenden Zahlen absieht. Dagegen stimmten die Werte für Cholesterin anfänglich nicht gut miteinander. Aber in den späteren, besonders die Menschenorgane betreffenden Untersuchungen, stimmten alle drei Werte fast vollkommen überein. Die einzelnen Organe sind nachgewiesenermaßen in absolut sterilem Zustande 7 bis 46 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden (in der Sommerperiode stieg die Zimmertemperatur manchmal auf 32° C). Dabei zeigte die Menge der hochmolekularen Fettsäuren und wohl auch die des Cholesterins keine Veränderung. Demnach ist der von Ohta bei der Pferdeleber festgestellte Befund von mir auch bei anderen Tieren und anderen Organen von neuem festgestellt worden. Somit bleibt das Gesamtquantum der hochmolekularen Fettsäuren selbst bei langdauernder Autolyse der inneren Organe bei Zimmertemperatur ganz unverändert. Es findet keine Fettneubildung aus Eiweiß bei der mit der fettigen Degeneration als identisch anzusehenden Autolyse statt, wie es manche Pathologen jetzt noch glauben. Der Befund, daß die mikroskopisch färbbaren Fettkügelchen mit der Dauer des Aufbewahrens in der Regel deutlich zunehmen, kann, wie eingangs erwähnt, nur so gedeutet werden, daß die anfänglich in komplizierten Molekülen eingelagerten Fettsäureradikale mit der Dauer der Autolyse allmählich von ihnen losgelöst werden und sich dabei in leicht sichtbare Modifikationen umwandeln.

Über das Verhalten des Calciums im Serum und über den Gehalt der Blutkörperchen an Calcium.

Von

P. Rona und D. Takahashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 30. Januar 1911.)

I.

Obgleich die Frage, in welcher Form sich das Calcium im Blute bzw. im Plasma befindet, eine der ältesten der physiologisch-chemischen Forschung ist, besitzen wir nur spärliche experimentelle Untersuchungen über diesen Gegenstand.[1]) Vor langer Zeit ausgeführte Bestimmungen von Pribram[2]), nach denen die Kalkwerte, nach direkter Fällung des Serums mit Ammoniumoxalat gewonnen, mit den nach dem Veraschen erhältlichen übereinstimmen sollen, haben keine genügende Beweiskraft für die Annahme, daß der Kalk nur in ionisierter Form im Serum vorhanden ist, da, wie Gerlach und Drechsel[3]) nachgewiesen haben, die Zahlen von Pribram infolge Verunreinigung seines Niederschlages durch Magnesiumammoniumphosphat zu hoch ausfallen mußten. Wenn auch die Annahme einer Eiweiß-Kalkverbindung im Serum wiederholt

---

[1]) Vgl. die Literatur hierüber bei Fr. Hofmeister, Ergebnisse d. Physiol. 10, 429, 1910.

[2]) R. Pribram, Ber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, 23, 279, 1871.

[3]) L. Gerlach, Ber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, 24, 349, 1872.

von verschiedenen Forschern gemacht worden ist, fehlte für das Vorhandensein eines nicht ionisierten Kalkalbuminats daselbst bis jetzt der experimentelle Beweis; wir stellten uns daher die Aufgabe, dieses Problem einer Prüfung zu unterziehen.

Zu diesem Zwecke benutzten wir die Methode der „Kompensationsdialyse“[1]), bei der die Verschiebung eines vorhandenen Gleichgewichtes nach Möglichkeit vermieden wird, im Gegensatz zu der gewöhnlichen Dialyse und den verschiedenen Filtrationsmethoden.[2]) Wir dialysierten in Reihenversuchen gegen eine isotonische Kochsalzlösung, die Calcium in ionisierter Form, als $CaCl_2$, in verschiedener Konzentration enthielt. Aus dem Gleichbleiben des Calciumgehaltes in einer Probe,[3]) aus der Zu- oder Abnahme desselben in anderen, ließ sich ein Rückschluß auf die diffusible Menge des Calciums im Serum machen und nach der direkten Bestimmung des gesamten Calciums nach Veraschen des Serums der diffusible Anteil desselben ermitteln.

Stets wurden 70 ccm Serum von verschiedenen Tierarten (Pferd, Rind, Schwein) gegen 50 ccm physiologische Kochsalzlösung mit vorher genau festgestelltem Calciumgehalt dialysiert. Die Calciumbestimmung erfolgte wie üblich nach trockener Ver-

---

[1]) Vgl. Zuntz und Loewy, Pflügers Archiv 58, 511, 1894; Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 14, 476, 1908; 21, 114, 1909; P. Rona, ebenda 29, 501, 1910.

[2]) Von neueren Arbeiten über diffusible Bestandteile des Blutserums vgl. namentlich L. Asher, diese Zeitschr. 14, 1, 1908, ferner R. Burian, Pflügers Arch. 136, 741, 1910.

[3]) Da wir mit isotonischen und nicht mit isosmotischen Lösungen arbeiten, wäre es theoretisch denkbar, daß anfangs vorübergehend auch in jenen Fällen, in denen die diffusible Calciummenge in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich ist, das Calcium entgegen seinem natürlichen Gleichgewicht eine minimale Verschiebung erfährt. Auf die Einstellung des Calciumgleichgewichtes innerhalb und außerhalb der Membran würde diese Verschiebung, auch wenn sie stattfinden sollte, nicht den geringsten Einfluß ausüben: schließlich muß in allen Fällen die Menge des diffusiblen Calciums in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich werden, und in den Fällen, in denen die Werte desselben von vornherein in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich oder nahezu gleich waren, werden sie auch nach Abschluß der Dialyse unverändert bleiben oder sich nur wenig ändern.

aschung durch Fällung mit Ammoniumoxalat und Wägung als CaO. Um jede Verunreinigung mit Magnesium auszuschließen, folgten wir bei der Fällung des Calciums streng den Vorschriften von Richards[1]). Die Bestimmung des Calciums in Form von $CaSO_4$ durch Fällung mit Alkohol in schwefelsaurer Lösung ist in calciumarmen und alkalireichen Flüssigkeiten nicht zu empfehlen.[2])

Die einzelnen Versuche verliefen wie folgt:

I. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g		
	sofort	nach 20 Stunden	nach 40 Stunden
I.	0,0133	0,0123	0,0114
II.	0,0091	0,0107	0,0099
III.	0,0045	0,0081	0,0085

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in %: 0,0169 g.

Betrachten wir die vorliegenden Befunde, so zeigt es sich, daß der Kalkgehalt in der Außenflüssigkeit I ab-, der in III zugenommen hat, während der in II nur unbedeutend zunahm, fast gleich geblieben ist. Wir werden demnach den Wert an „diffusiblem" CaO zwischen den Werten 0,0133% und 0,0091% annehmen müssen.

Eine genauere Berechnung läßt sich folgendermaßen ausführen. Werden A Teile gegen B Teile Außenflüssigkeit dialysiert und ist der %-Gehalt der Außenflüssigkeit an CaO vor der Dialyse a, nach Abschluß der Dialyse b, so ergibt sich die Menge des diffusiblen CaO im Serum[3]) in % nach der Gleichung

$$\frac{b(A+B)-aB}{A}$$

Auf diese Weise finden wir für den diffusiblen Kalk in I 0,0115 bzw. 0,0100%, in II 0,0118 bzw. 0,0105%, in III 0,0106 bzw. 0,0114%.

---

[1]) Th. W. Richards, Ch. Mc Caffrey und H. Bisbee, Zeitschr. f. anorgan. Chem. 28, 71, 1901.

[2]) Vgl. hierzu H. Aron in Abderhaldens Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden 1, 407, 1910.

[3]) Unter der Voraussetzung, daß das Gleichgewicht zwischen diffusiblem und nicht diffusiblem Calcium im Serum während der Dialyse nicht oder nur ganz unbedeutend gestört wird; eine Bedingung, die bei unserer Versuchsanordnung zutrifft.

als Mittel 0,0110%. Angesichts der äußerst niedrigen analytisch ermittelten absoluten Zahlen ist die Übereinstimmung der berechneten Werte wohl befriedigend. Jedenfalls zeigt der Versuch, daß die Methode nicht nur den Sinn der Änderung im Calciumgehalt der Außenflüssigkeit richtig wiedergibt, sondern auch in guter Annäherung die Menge des diffusiblen Calciums festzustellen gestattet. Daß bei den niedrigen absoluten Zahlen die prozentischen Werte mit einem relativ großen Fehler behaftet sind, ist natürlich; der Größenordnung nach wird aber der Wert für das diffusible Calcium zweifellos richtig angegeben. — Die direkte Bestimmung im Serum ergab 0,0169% CaO. Also, obgleich diese CaO-Menge gegen eine von 0,0133% dialysiert hat, nahm letztere während der Dialyse ab und nicht, wie man erwartet hätte, zu! — Von den 0,0169 g Kalk waren nach obiger Feststellung 0,0110 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 65% diffusibel, 35% nicht diffusibel.

II. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g		
	sofort	nach 14 Stunden	nach 20 Stunden
I.	0,0133	0,0119	0,0111
II.	0,0091	0,0110	0,109
III.	0,0045	0,0084	0,0084

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in %: 1. 0,0173, 2. 0,0169.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III stark zu, in II nur ganz wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0112%. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0171 g CaO. Davon sind 0,0112 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 65,5% diffusibel, 34,5% nicht diffusibel.

III. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g		
	sofort	nach 18 Stunden	nach 24 Stunden
I.	0,0133	0,0109	0,0115
II.	0,0079	0,0100	0,0103
III.	0,0049	0,0090	0,0081

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in %: 1. 0,0173, 2. 0,0175.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III stark, in II ein wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0115%. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0174 g CaO. Davon sind 0,0115 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 66% diffusibel, 34% nicht diffusibel.

IV. Schweineserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g		
	sofort	nach 24 Stunden	nach 59 Stunden
I.	0,0157	0,0120	0,0110
II.	0,0082	0,0090	0,0085
III.	0,0036	0,0085	0,0082

CaO-Gehalt des Schweineplasmas in %: 0,0130.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III zu, in II nur ganz wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0097%. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0130 g CaO. Davon sind 0,0097 g diffusibel, 0,0033 g nicht diffusibel, d. h. 75% diffusibel, 25% nicht diffusibel.

V. Schweineserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g	
	sofort	nach 48 Stunden
I.	0,0155	0,0122 0,0122
II.	0,0087	0,0087 0,0083
III.	0,0033	0,0086 0,0081

CaO-Gehalt des Schweineserums in %: 0,0138.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III zu, in II blieb er (fast) unverändert. Die Menge des diffusiblen Kalkes wird also diesem Werte nahe entsprechen. Gefunden wurde nach Veraschung im Serum in 100 g 0,0138 g CaO. Davon sind 0,0087 g diffusibel, 0,0051 g nicht diffusibel, d. h. 63% diffusibel, 37% nicht diffusibel.

VI. Rinderserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g	
	sofort	nach 64 Stunden
I.	0,0166	0,0122
II.	0,0082	0,0096
III.	0,0040	0,0080

CaO-Gehalt des Rinderplasmas in %: 0,00130.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III bedeutend zu, in II viel weniger zu. Für den diffusiblen Kalk berechnen sich aus diesen Daten 0,0102%. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0130 g CaO. Davon sind 0,0102 g diffusibel, 0,0028 g nicht diffusibel, d. h. 78% diffusibel, 22% nicht diffusibel.

Aus der Gesamtheit dieser Versuche geht unzweifelhaft hervor, daß eine nennenswerte Menge des Calciums (etwa 25 bis 35%) im Serum in nicht diffusibler Form vorhanden ist. Spezielle Angaben über diese nicht diffusible Form gibt der Versuch zunächst nicht. Vor allem auf Grund der neueren Untersuchungen von Pauli und Samec[1]) werden wir jedoch hier wohl eine Bindung des Ca an die Serumeiweißkörper annehmen müssen. Auf die biologische Bedeutung dieser Tatsache, namentlich hinsichtlich des Transportes unlöslicher oder schwer löslicher Kalksalze sei hier nur kurz hingewiesen.

II.

Vor einiger Zeit wies Hamburger[2]) auf die Tatsache hin, daß entgegen der bisherigen Anschauung die Blutkörperchen, speziell die des Rindes, Calcium enthalten. Da wir die Absicht hatten, die Verteilung des Calciums im Blute unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, mußten wir zunächst eine Anzahl Bestimmungen über den Calciumgehalt der Blutkörperchen einiger Tierarten (Rind, Schwein, Pferd, Hammel, Hund) unter normalen Ernährungsbedingungen ausführen, um eine Grundlage für die späteren Untersuchungen zu besitzen. Die Bestimmung des Calciumgehaltes der Blutkörperchen erfolgte in einer Reihe von Versuchen indirekt, so, daß wir den Calciumgehalt des Gesamtblutes und des Serums genau ermittelten, dann mittels eines Hedinschen Hämatokriten von sehr hoher (10000) Tourenzahl die prozentische Verteilung der Blutkörperchen und des Serums bestimmten. Aus den so gewonnenen Daten läßt sich dann der Calciumgehalt der Blutkörperchen berechnen. — In einer Anzahl Fälle stellten wir den Calciumgehalt der Blutkörperchen auch direkt fest. In diesen Versuchen wurde das Blut in einer elektrisch getriebenen Zentrifuge (mit ca. 4000 Touren in der Minute) 30 Minuten zentrifugiert, dann das Serum möglichst genau mit der oberflächlichen Blutkörperchenschicht zusammen abgehoben, danach der Blutkörperchenbrei noch 3 bis 4 mal

[1]) Pauli und Samec. Diese Zeitschr. 17, 235, 1909.

[2]) H. J. Hamburger, Zeitschr. f. physikal. Chem. 69, 663, 1910; ferner Hamburger und Bubanovic, Arch. intern. de phys. 10, 1, 1910; vgl. hierzu aber Gryns, Konigl. Akad. van Wetensch. Amsterdam 19, 475; Nach Chem. Centralbl. 2, 1486, 1910.

je ca. 30 Minuten zentrifugiert, wobei jedesmal die oberflächliche Serumschicht sehr sorgfältig entfernt wurde.

Die gewonnenen Resultate sind in den folgenden Tabellen niedergelegt.

I. Rind.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
1	45	55	0,0087 0,0087	0,0133 0,0127	0,0034
2	44	56	0,0089 0,0091	0,0130 0,0130	0,0039
3	42	58	0,0089 0,0087	0,0131 0,0131	0,0028
4	48	52	0,0080 0,0078	0,0135 0,0135	0,0019

II. Schwein.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
5	46	54	0,0095 0,0091	0,0129 0,0135	0,0047
6	47	53	0,0090 0,0092	0,0138	0,0038
7	48	52	0,0088 0,0083	0,0128 0,0132	0,0038
8	50	50	0,0080 0,0082	0,0130 0,0134	0,0030

III. Pferd.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
9	43	57	0,0107 0,0105	0,0173 0,0175	0,0016
10	43	57	0,0110 0,0110	0,0167 0,0171	0,0032
11	47	53	0,0109 0,0101	0,0173 0,0169	0,0029
12	44	56	0,0107 0,0107	0,0167 0,0169	0,0030

IV. Hammel.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
13	50	50	0,0089	0,0157	0,0020
14	52	48	0,0086	0,0143	0,0022
15	42	58	0,0091	0,0141	0,0029
16	46	54	0,0091	0,0165	0,0041

V. Hund.

	Hämatokrit.-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
17	37	63	0,0111	0,0161	0,0025
18	25	75	0,0125	0,0157	0,0030

Die direkten Bestimmungen des CaO in den Blutkörperchen gaben folgende Resultate in Gew.-%.

19. Hammel 0,0027 (indirekt 0,0020)
20. Hammel 0,0032 (indirekt 0,0029)
21. Hammel 0,0034
22. Hund 0,0024 (indirekt 0,0025)
23. Pferd 0,0022
24. Pferd 0,0030
25. Rind 0,0036
26. Rind 0,0040
27. Schwein 0,0030
28. Schwein 0,0031

Es ergibt sich demnach sowohl auf indirektem, wie auch auf direktem Wege in Übereinstimmung mit dem Befunde von Hamburger, daß die Blutkörperchen der untersuchten Tierarten Calcium, wenn auch in sehr geringer Menge (etwa 0,0025 bis 0,0035%) enthalten. Weder die indirekte noch die direkte Bestimmung ist frei von Fehlerquellen. Die Hämatokritzahlen sind jedoch durch wiederholte Bestimmungen möglichst genau auf ihre Richtigkeit kontrolliert worden, so daß man berechtigt war, sie als Grundlage für die Berechnung der Ca-Werte in den Blutkörperchen zu benutzen. Und auch die den Blut-

körperchen etwa noch beigemengten Spuren Serum können bei der direkten Bestimmung der abzentrifugierten Blutkörperchen die erhaltenen Werte kaum nennenswert verschieben. Selbst wenn wir die sicher nicht zutreffende, übertriebene Annahme machen, die Blutkörperchen enthielten noch 5% Serum, wären die gefundenen Werte nicht erklärt. Wir glauben demnach annehmen zu können, daß die gefundenen Ca-Zahlen außerhalb des Bereichs der Fehlergrenzen der angewandten Methoden liegen. Wie die Untersuchungen Hamburgers[1]) zeigen, wird das Calcium beim Waschen der roten Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung aus den Blutkörperchen entfernt; daraus wird erklärlich, daß die von früheren Forschern an sorgfältig gewaschenen Blutkörperchen angestellten Untersuchungen das Calcium vermissen ließen. Was die Genauigkeit der von uns gefundenen Zahlen anlangt, muß darauf hingewiesen werden, daß sich bei den äußerst niedrigen absoluten Zahlen die analytischen Fehler bereits sehr bemerkbar machen müssen. Unter diesen Umständen müssen wir die Übereinstimmung der Werte der direkten und der indirekten Bestimmung als recht befriedigend ansehen.

[1]) l. c.

Über Ester- und Fettspaltung im Blute und im Serum.

Von

Peter Rona und Leonor Michaelis.

Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 9. Februar 1911.)

Mit 23 Figuren im Text.

Die zahlreichen Untersuchungen über Fett- und Esterspaltung im Blute und in den Geweben führten bis jetzt zu widerspruchsvollen Resultaten.[1]) Infolge fehlerhafter Ausführung der zur Feststellung einer stattgehabten Spaltung angewandten Methodik — Titration der entstandenen Säure — sind die Befunde einer Reihe von Forschern, wie dies Saxl kritisch beleuchtet hat[2]), nicht zu verwerten. Aber auch bei Innehaltung der nötigen Kautelen ist ein auf dem Nachweis der gebildeten Säure begründetes Verfahren zu einer eindeutigen Feststellung der vorliegenden Verhältnisse wenig geeignet. Saxl kam daher auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß „keine der bisher empfohlenen Methoden ein quantitatives Studium der Esterspaltung gestattet, da die gewonnenen Werte entweder bei kurzer Versuchsdauer so gering sind, daß sie kaum außerhalb der Fehlergrenze liegen, oder aber (bei langer Versuchsdauer) durch die mit den Bestimmungsmethoden verbundenen Fehlerquellen getrübt werden". Sollte demnach einem Fortschritt in der Erforschung dieses Problems der Weg geebnet werden, so mußte eine Methode zur Verwendung kommen, die auf einwandfreiere Weise die Esterspaltung festzustellen

[1]) Vgl. die Literatur hierüber bei Connstein, Ergeb. d. Physiol. 3, 194, 1904 und C. Oppenheimer, Die Fermente, 3. Aufl., 1909.

[2]) Saxl, Diese Zeitschr. 12, 343, 1908.

befähigt ist und auch gestattet, in den Gang der Spaltung einen genauen Einblick zu erhalten.

Selbstverständlich wird jede Eigenschaft, die den zu spaltenden Körper den Spaltprodukten gegenüber auszeichnet, dazu dienen können, ein Verschwinden des gespaltenen Körpers bzw. das Auftreten seiner Spaltprodukte nachzuweisen, wenn nur der Nachweis einer Änderung des ursprünglichen Verhaltens im Verlaufe des fermentativen Prozesses eindeutig auf diesen bezogen werden kann. Wir besitzen nun in der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen der Ester im Vergleiche zu der ihrer Spaltprodukte ein Charakteristikum von ganz hervorragender Schärfe. Während z. B. die Glycerinester zu den sehr „oberflächenaktiven" Stoffen gehören — Stoffe, die die Spannung des reinen Lösungsmittels schon in sehr geringer Konzentration stark erniedrigen — ändern die entstehenden Spaltprodukte, die entsprechenden Salze der (niederen) Fettsäuren und das Glycerin die Oberflächenspannung nur ganz unbedeutend. Stellt man also die Oberflächenspannung einer gesättigten Monobutyrinlösung nach der Tropfenmethode fest, indem man die Tropfen zählt, die bei dem Entleeren eines gewissen Volumens der Flüssigkeit aus einer Capillarröhre gebildet werden, so wird man nach einer mehr oder weniger langdauernden Alkaliwirkung finden, daß die Oberflächenspannung den Wert des reinen Wassers (fast) erreicht hat. So wurde bei einer gesättigten wässerigen Monobutyrinlösung in einem Capillarröhrchen (bei 18°) die Tropfenzahl 170 gefunden. Wurde diese Lösung mit Natronlauge zu $^1/_{10}$ n versetzt und kurz aufgekocht, so sank die Tropfenzahl gleich auf 109, nach etwa 1 Stunde auf 98, während die Tropfenzahl in derselben Capillarröhre für reines Wasser 97 betrug. (Alles bei 18° gemessen.) Bei schwächeren Alkalikonzentrationen und niedrigeren Temperaturen verlief die Spaltung durch das Alkali entsprechend langsamer, wie dies durch die langsamere Abnahme der Tropfenzahl auf bequeme Weise nachgewiesen werden konnte. Somit hätten wir in der Feststellung der Oberflächenspannungsänderung einen empfindlichen Indikator für den Nachweis einer stattgehabten Spaltung und ein Mittel, den Gang der Spaltung während des Prozesses zu verfolgen. Die Änderung der Oberflächenspannung als Maß für den Verlauf

physiologisch-chemischer Prozesse wurde schon von Traube in mehreren Arbeiten, wie auch von Ascoli und Izar in verschiedenen Untersuchungen benutzt.

Sollte diese Methode für den Nachweis einer Esterspaltung im Blute bzw. Serum anwendbar sein, so mußte sie folgende Bedingungen erfüllen. Das Monobutyrin durfte zunächst durch Wasser allein in den bei den Versuchen angewandten Temperaturen und in den in Betracht kommenden Zeiten keine Spaltung erleiden. Dies ist auch der Fall. Wurde die gesättigte wässerige Monobutyrinlösung mit verschiedenen Mengen Wasser versetzt, so erhielt man folgende Kurve (Fig. 1).

Die Abszisse gibt die Konzentration der Lösung an Monobutyrin an, wobei mit 100 die gesättigte wässerige Lösung bezeichnet ist, während die Ordinate die „Tropfenzahl" der zugehörigen Monobutyrinlösung bei 18° angibt. Die Kurve hat die bekannte Gestalt der „Oberflächenspannungs-Konzentrationskurve": die Oberflächenspannungserniedrigung ist bei niedriger Konzentration des Monobutyrins relativ größer als bei höherer. — Worauf es hier ankommt, ist, daß dieselben Werte der Tropfenzahl (bei derselben Temperatur) auch bei längerem — mehrtägigem — Aufbewahren der betreffenden Lösungen unverändert erhalten werden. Ferner durfte die Alkalität des Blutes, d. h. die dort herrschende OH'-Ionen-Konzentration, keine hydrolytische Wirkung auf den Ester ausüben. Zu diesem Zwecke versetzten wir die Esterlösung mit einem Phosphatgemisch (zu ca. $^1/_{30}$ n) von einer H'-Ionen-Konzentration, die der des Blutes entspricht ($0{,}35 \cdot 10^{-7}$). Selbst nach Tagen war bei 18° keine Änderung der ursprünglich gefundenen Oberflächenspannung zu konstatieren. — Daß auch die Eiweißkörper oder sonstige Serumbestandteile keine Spaltung, die an einer Änderung der Tropfenzahl nachweisbar wäre, veranlassen, beweisen die

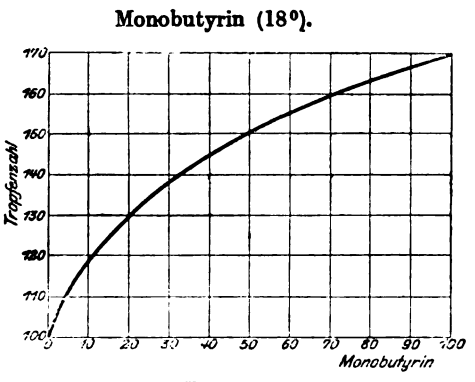


Fig. 1.

unten angeführten Versuche, die die Wirkungslosigkeit des aufgekochten (oder mit FNa versetzten) Serums zeigen.[1])

Auf Grund dieser Vorversuche konnten wir also eine durch Blut oder Serum bedingte Änderung der Oberflächenspannung der Monobutyrinlösungen auf eine fermentative Spaltung des Monobutyrins beziehen.

Die diesbezüglichen Untersuchungen sind in den folgenden Kurven (Fig. 2 bis 12) niedergelegt. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Tropfenzahl bei 18° an.

I. Pferd.

I. Serum 2,5:50[2]). II. Serum-FNa 2,5:50.

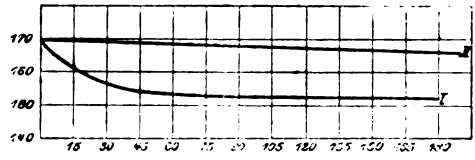


Fig. 2.

II. Kaninchen.

I. Serum 2,5:50.

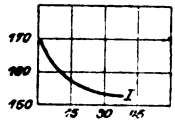


Fig. 3.

III. Kaninchen.

I. Serum 2,5:50.

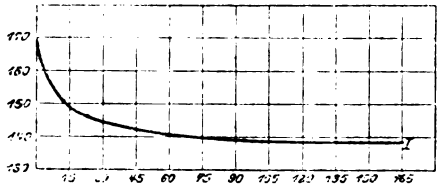


Fig. 4.

IV. Kaninchen.

I. Serum 1:50. II. Blut 1:50.
III. Serum (aufgekocht) 1:50.
IV. Serum-FNa 1:50.

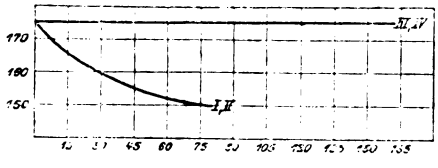


Fig. 5.

V. Rind.

Serum 1:50. Serum 2:50.

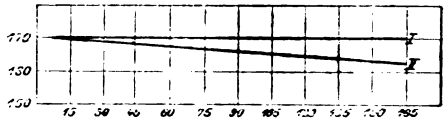


Fig. 6.

[1]) Das Serum resp. Blut übt, wie bereits Traube für die genuinen Eiweißkörper gefunden hat, nur einen äußerst geringen Einfluß auf die Oberflächenspannung des Wassers aus.

[2]) Serum 2,5:50 bedeutet 2,5 ccm Serum + Monobutyrin gesättigte Lösung auf 50 ccm usw.

VI. Rind.

I. Blut 1:50. II. Serum 1:50. III. Serum-FNa 5:50. IV. Serum 5:50.

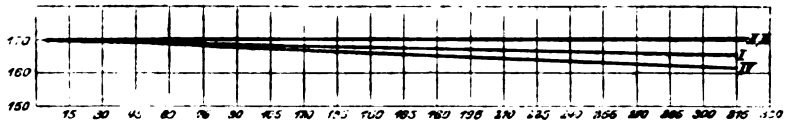


Fig. 7.

VII. Hund.

I. Blut 1:50. II. Blut 4:50. III. Serum 1:50.
IV. Serum-FNa 4:50. V. Serum 4:50.

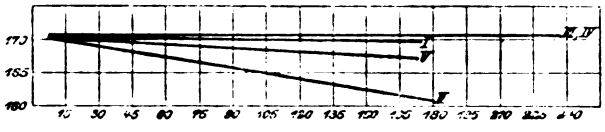


Fig. 8.

VIII. Meerschweinchen.

I. Blut 1:50. II. Serum 0,5:50.
III. Serum-FNa 0,5:50.

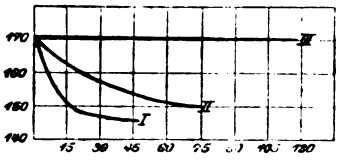


Fig. 9.

IX. Meerschweinchen.

I. Serum 1:50.

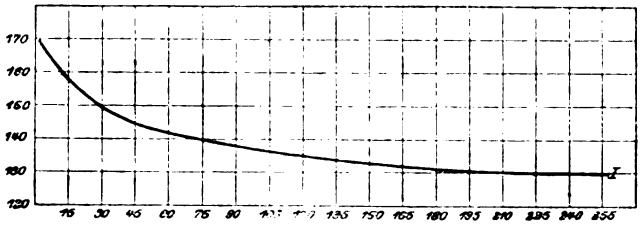


Fig. 10.

X. Kaninchen.

I. Kaninchenserum 0,5:50. II. Serum auf 70° erwärmt 0,5:50. III. Serum aufgekocht 0,5:50.

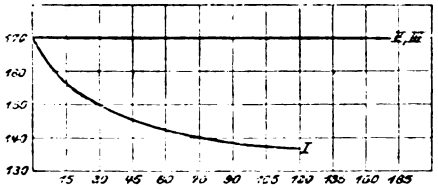


Fig. 11.

XI. Hammel.

I. Blut 1:50. II. Blut 4:50. III. Serum 1:50.
IV. Serum 4:50. V. Serum-FNa 4:50.

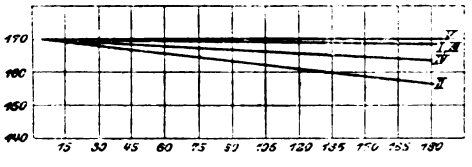


Fig. 12.

Methodisch wäre zu den Kurven zu bemerken, daß alle in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen im Wasserbade von 18° durchgeführt worden sind. Während der Untersuchung schwankte die Temperatur höchstens um $\pm 0{,}5°$; da die Zu- oder Abnahme der Tropfenzahl mit der Zu- oder Abnahme der Temperatur um 1° in diesem Temperaturbereich etwa 2 beträgt, so kann der durch diese geringe Schwankung der Temperatur bedingte Fehler vernachlässigt werden. — Der Fehler in der Bestimmung der Tropfenzahl beträgt ± 1 Tropfen. Da die beobachteten Differenzen 20 bis 50, oft bis 70 Tropfen betragen, kann die Beobachtung als genau bezeichnet werden. Dazu kommt, daß bereits die äußerst geringen Änderungen von 2 bis 3 Tropfen verwendet werden können, da sie im Vergleich mit dem vorherigen und dem nach einer gewissen Zeit aufgenommenen Befund ein zuverlässiges Bild über das Fortschreiten oder Stillstehen des Prozesses geben.

Aus den Kurven ist nun ersichtlich, daß in allen untersuchten Tierarten die Gegenwart eines Monobutyrin spaltenden Fermentes im Serum bzw. Blut angenommen werden muß. Besonders stark wirksam ist das Ferment bei Meerschweinchen und Kaninchen; schon nach wenigen Minuten tritt eine energische Spaltung ein, die von einem gewissen Punkt an einer sehr allmählichen Hydrolyse Platz macht. Die Spaltungsprodukte, namentlich die freiwerdende Säure, übt, wie dies schon Hanriot gefunden hat, einen hemmenden Einfluß auf den Verlauf der fermentativen Wirkung[1]). Serum und Blut erwiesen sich bei diesen Tierarten als gleich wirksam. — Viel schwächer war die

[1]) Es muß auch darauf hingewiesen werden, daß die entstandene Buttersäure — sofern sie nicht von den Kationen des Blutes resp. Serums in Beschlag genommen wird und so als fettsaures Salz so gut wie keine Wirkung auf die Oberflächenspannung ausübt — die Oberflächenspannung stark erniedrigt und ein Fortschreiten des fermentativen Prozesses nicht klar erkennen läßt. Bei quantitativer Untersuchung der Hydrolyse wird es sich demnach empfehlen, künftighin die Lösung mit einem Phosphatgemisch als Reaktionsregulator zu versehen, das das Auftreten von freier Säure verhindern soll. — Ein Stillstand des Prozesses könnte auch durch ein echtes Gleichgewicht zwischen dem Ester und seinen Spaltprodukten veranlaßt werden. Bis jetzt ist es uns jedoch nicht gelungen, eine Rückbildung des Butyrats aus seinen Spaltprodukten unter dem Einfluß des Fermentes experimentell nachzuweisen.

Wirkung der „Monobutyrase" bei Pferd, Hammel, Rind, Hund, und bei all diesen übertrifft die Wirksamkeit des Blutes die des Serums um das mehrfache. Das vorherige Aufkochen des Serums hebt die spaltende Wirkung auf, Zusatz von FNa hemmt sie sehr bedeutend.

Wie sich andere Tierarten und der Mensch in bezug auf die Esterspaltung verhalten und ob durch verschiedene Eingriffe, namentlich durch die Ernährung, der Fermentgehalt des Blutes beeinflußbar ist, werden weitere von uns in Angriff genommene Untersuchungen lehren.

II. Die vorangehende Untersuchung stellt in Übereinstimmung mit Hanriot in einer Anzahl Blut- und Serumarten die Gegenwart eines das Monobutyrin spaltenden Fermentes fest. Auf dieselbe Weise konnte nun weiterhin ein das Tributyrin spaltendes Ferment, also eine echte Lipase im Blut und Serum nachgewiesen werden.

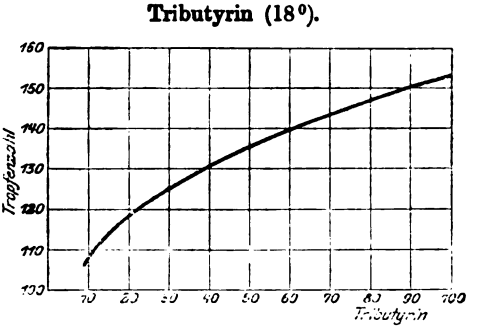


Fig. 13.

Trotz der äußerst geringen Löslichkeit des Tributyrins in Wasser genügen die gelösten Spuren, um die Oberflächenspannung des Wassers sehr stark zu erniedrigen. So zeigte eine Capillarröhre für reines Wasser die Tropfenzahl 97 (18°), für eine gesättigte Tributyrinlösung 154. Die Änderung der Oberflächenspannung einer wässerigen Tributyrinlösung für wechselnde Konzentration an Tributyrin zeigt die Kurve (Fig. 13), wobei mit 100 die gesättigte Tributyrinlösung bezeichnet ist.

Auch hier konnte festgestellt werden, daß das Wasser in den in Frage kommenden Temperaturgebieten und Zeiträumen keine Spaltung veranlaßt und daß die im Blut herrschende OH'-Ionenkonzentration selbst nach Tagen bei 18° keine Spaltung bewirkt.

Den Verlauf der einzelnen Versuche zeigen die folgenden Kurven (Fig. 14 bis 23). Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Tropfenzahl bei 18° an.

XII. Rind.

I. Blut 1:25. II. Serum 0,5:25. III. Serum 2:25. IV. Serum-FNa 2:25.[1])

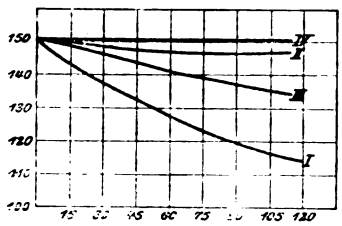


Fig. 14.

XIII. Rind.

(Dasselbe Blut wie in XII., einen Tag später.)
I. Blut 1:25. II. Serum 1:25.

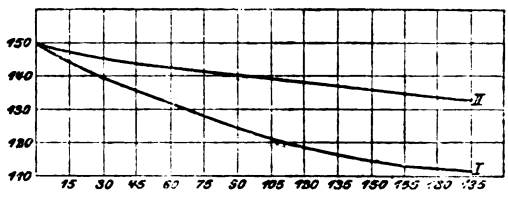


Fig. 15.

XIV. Rind.

I. Blut 0,2:25. II. Serum 0,2:25. III. Blut 1:25. IV. Serum 1:25.

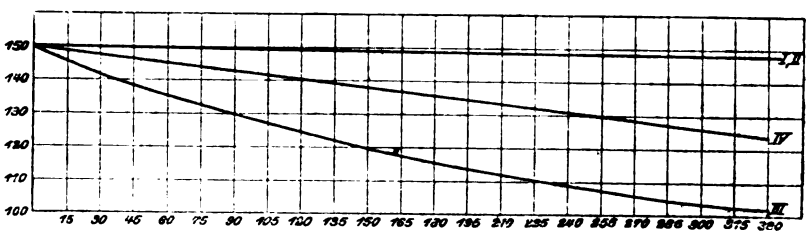


Fig. 16.

XV. Schwein.

I. Blut 1:25. II. Blut 2:25. III. Serum 1:25. IV. Serum 2:25.

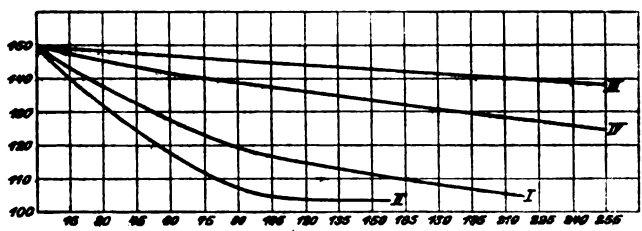


Fig. 17.

XVI. Schwein.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,5:25.

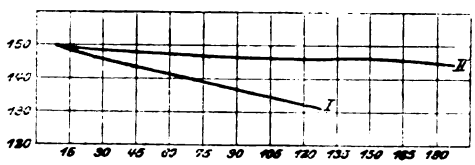


Fig 18.

[1]) Blut 1:25 bedeutet 1 ccm Blut+Tributyrin (gesättigte Lösung) auf 25 ccm usw.

XVII. Schwein.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,2:25. III. Serum 2:25.

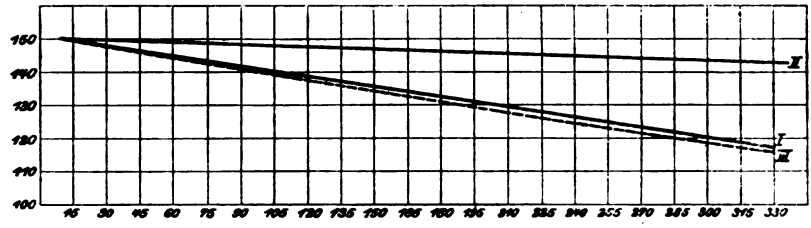


Fig. 19.

XVIII. Meerschweinchen.

I. Blut 1:50. II. Serum 1:50.
III. Serum-FNa 1:50.

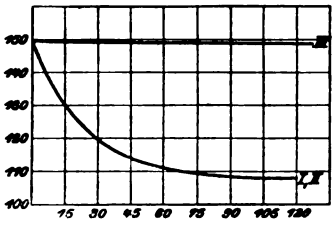


Fig. 20.

XIX. Meerschweinchen.

I. Blut 0,5:25. II. Blut 0,05:25.
III. Serum 0,5:25. IV. Serum 0,05:25.
V. Serum 0,05:25 aufgekocht.

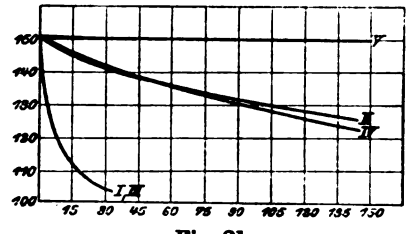


Fig. 21.

XX. Hammel.

I. Blut 0,5:25. II. Blut 1:25. III. Serum 0,5:25. IV. Serum 1:25.

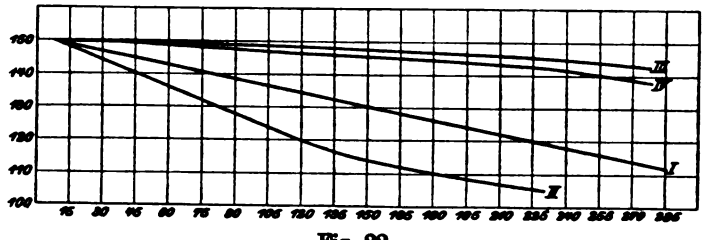


Fig. 22.

XXI. Kaninchen.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,5:25. III. Serum-FNa 0,5:25.

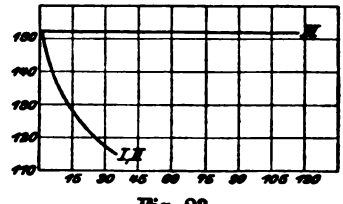


Fig. 23.

Im wesentlichen decken sich die Befunde hier mit denen am Monobutyrin gewonnenen: starke Wirkung beim Meerschweinchen und Kaninchen, sehr schwache beim Rind, Schwein, Hammel. Auch hier fand sich, Kaninchen und Meerschweinchen ausgenommen, das Serum durchweg viel schwächer wirksam als das entsprechende Blut. Es liegt daher nahe, in beiden Fällen nur ein Ferment anzunehmen. Kochen des Serums hob die Wirkung auch auf Tributyrin auf, FNa hemmt sie sehr stark.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt und auch auf Organe bzw. Preßsäfte ausgedehnt. Dieselbe Methode soll auch auf die Erforschung des proteolytischen Fermentes ausgedehnt werden, da, wie die Untersuchungen von Traube zeigen, die Eiweißkörper die Oberflächenspannung des Wassers, im Gegensatz zu ihren höheren Spaltprodukten, nicht beeinflussen.

Nachtrag zu der Arbeit:

Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus.[1])

Von

Wilhelm Völtz und August Baudrexel.

(Eingegangen am 2. Februar 1911.)

Wir hatten in der betreffenden Arbeit über den N-Umsatz und -Ansatz, sowie den Energieumsatz während einer Grundregimeperiode und einer Hefeperiode (es wurden 100 g entbitterte Hefe pro die verzehrt) am Menschen berichtet und konstatiert, daß das Hefeeiweiß zu 86%, die Calorien der Hefe zu 88% resorbiert wurden. Der physiologische Nutzeffekt der Hefe hatte auf das Stickstoffgleichgewicht berechnet 74,8% ihres Energiegehaltes betragen. Da die Trockenhefe ungefähr 45% verdauliches Eiweiß enthält, so hatten wir gefolgert, daß sie den konzentriertesten und speziell eiweißreichsten Nahrungsmitteln zuzurechnen wäre.

Nun erschien es weiterhin von Interesse, zu untersuchen, wie hoch die Verdaulichkeit der organischen Substanz und der einzelnen N-freien Nährstoffe der Hefe, also des Fettes, der Rohfaser und der stickstofffreien Extraktstoffe [Organische Substanz — (Rohprotein + Rohfett + Rohfaser)] ist. Um die betreffenden Zahlen zu ermitteln, war es nur erforderlich, die Faeces der beiden in Betracht kommenden Perioden nach der Weender-Methode zu analysieren, da die erforderlichen Daten für die Hefe bereits vorlagen (l. c.).

Es wogen die lufttrockenen Faeces im Mittel pro die
während der Grundregimeperiode 36,97 g,
„ „ Hefeperiode . . 54,10 g.

Die folgende Tabelle I enthält die Zahlen für den Gehalt der Faeces beider Perioden an Einzelbestandteilen in Prozent,

[1]) Diese Zeitschr. 30, 457 bis 472, 1911.

Tabelle II dieselben in Gramm pro die. Aus den differenten Werten sind nach Gegenüberstellung derselben mit den betreffenden Daten über die Zusammensetzung der verzehrten Hefe in Tabelle III die Verdauungskoeffizienten der einzelnen Nährstoffe der Hefe berechnet und ebenfalls in Tabelle III eingetragen worden.

Tabelle I.

Die Faeces enthielten in Prozent:

	Trockensubstanz %	Asche %	Organische Substanz %	Rohprotein (N×6,25) %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
Grundregimeperiode	86,88	10,69	76,19	32,81	16,19[1])	3,49	23,70
Hefeperiode . . .	82,31	13,71	68,60	36,16	12,83[2])	3,99	15,62

Tabelle II.

Die Faeces enthielten in Gramm im Mittel pro die:

	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein (N×6,25) g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g
Grundregimeperiode (36,97 g pro die)	32,12	3,95	28,17	12,13	5,99	1,29	8,76
Hefeperiode (54,10 g pro die)	44,53	7,42	37,11	19,56	6,94	2,16	8,45
Differenz:	—	—	8,94	7,43	0,95	0,87	- 0,31

Tabelle III.

	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein (N×6,25) g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g
100 g Hefe enthielten	93,13	7,04	86,09	53,44	3,12	1,44	28,09
Im Kot der Hefeperiode mehr als im Kot der Grundregimeperiode . .			8,94	7,43	0,95	0,87	- 0,31
Resorbiert: g			77,15	46,01	2,17	0,57	28,40
Resorbiert: %			89,6	86,1	69,6	39,6	101

[1]) 14,74% freies Fett und 1,45% Fett aus Seifen.

[2]) 11,42% „ „ „ 1,41% „ „ „

Die Werte für den verdaulichen Anteil des Fettes und insbesondere der Rohfaser können keinen Anspruch auf große Genauigkeit machen, weil der Gehalt der Hefe an diesen Stoffen ein zu geringer ist, als daß man auf diesem Wege zu ganz genauen Zahlen gelangen könnte. Cellulose, die den Hauptbestandteil der Rohfaser auszumachen pflegt, enthält die Hefe überhaupt nicht[1]). Die als Rohfaser bezeichnete Substanz ist bekanntlich der in 1,25%iger Schwefelsäure und ebensolcher Kalilauge (Weender-Methode) unlösliche Rückstand der zu untersuchenden Substanz nach Subtraktion der Asche und der N-haltigen Verbindungen (N × 6,25). Die übrigen N-freien Stoffe der Hefe sind vollständig resorbiert worden. Die um 1% höher gefundene Verdaulichkeit der N-freien Extraktstoffe liegt innerhalb der Fehlergrenzen des Stoffwechselversuches bzw. der analytischen Methoden.

Das Resultat dieser Untersuchung ist, daß die Nährstoffe der Hefe, und zwar

die organische Substanz zu rund . . .	90%
das Eiweis (N × 6,25) zu rund . . .	86%
das Rohfett zu rund	70%
die Rohfaser zu rund	40%
und die N-freien Extraktstoffe zu rund	100%

im menschlichen Organismus resorbiert wurden.

---

[1]) C. van Wisseling, Jahrb. wiss. Bot. 31, 619, 1898.

Bemerkungen zu der Arbeit von Stoklasa und Zdobnický:

Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll.[1])

Von

Walther Löb.

(Aus der chem. Abteil. des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1911.)

In der in der Überschrift zitierten Arbeit schreiben die Verfasser: „Schon längere Zeit tragen wir uns mit der Idee, das Problem zu lösen, wie eigentlich die Synthese der Kohlenhydrate in der lebenden Zelle der autotrophen Pflanzen vor sich geht." Dieser angestrebten Lösung dienen folgende Beobachtungen:

1. Aus Kohlensäure, Wasserdampf und Kalilauge entstehen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Spuren Formaldehyd; eine Kondensation des letzteren zu Kohlenhydrat tritt aber bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd nicht im geringsten ein, „obgleich die Bedingungen für die Entstehung des Kohlenhydrates, nämlich die Dauer der Bestrahlung usw., die gleichen waren, wie bei den folgenden (positiv verlaufenden) Versuchen".

Aus diesen Worten geht hervor, daß Stoklasa und Zdobnický dem Formaldehyd, der aus Kohlensäure und Wasser entsteht, andere Eigenschaften zuschreiben als dem aus Kohlensäure und Wasserstoff in statu nascendi gebildeten. Denn der letztere liefert nach ihren Versuchen unter den gleichen Bedingungen reichlich Kohlenhydrat. Der Sachverhalt ist natürlich der folgende. Im ersten Falle ist so wenig Formaldehyd entstanden, daß, besonders da ein Teil sogleich in die Waschflasche durch den Gasstrom fortgeführt, ein anderer Teil durch die Kalilauge in Methylalkohol und Ameisensäure verwandelt wird, die Ausbeute an Kondensationsprodukten zum Nachweis zu gering wird. Sind die Bedingungen der Formaldehydausbeute günstiger ($CO_2 + H_2$), so bildet sich durch die Kalilauge auch entsprechend mehr Kohlenhydrat.

---

[1]) Diese Zeitschr. 30, 433, 1911.

2. Die Verfasser finden, daß nur Wasserstoff in statu nascendi mit Kohlensäure Formaldehyd gebe, nicht aber Wasserstoffgas. Sie erwähnen, daß ihre Beobachtungen nicht mit denen von Berthelot und Gaudechon[1]) übereinstimmen; auch nicht mit meinen, bei der stillen Entladung erhaltenen.[2]) Aber aus ihren eigenen Versuchen geht hervor, daß sich auch bei ihnen die Reaktion zu Formaldehyd zwischen gasförmigem Wasserstoff und gasförmiger Kohlensäure abspielt. Sie finden nämlich den Formaldehyd in der an den Rückflußkühler erst angeschlossenen Waschflasche. Der Formaldehyd wird also durch den Gasstrom fortgeführt. Wäre er in der Flüssigkeit entstanden, was bei einer Reduktion durch Wasserstoff in statu nascendi der Fall sein müßte, so könnte er sich nicht aus der in großem Überschuß vorhandenen Lauge, die ihn sofort kondensiert oder spaltet bzw. als Salz[3]) enthält, in irgendwie erheblichen Mengen bei gewöhnlicher Temperatur verflüchtigen.

3. Stoklasa und Zdobnický sprechen weiter über den chemischen Charakter der durch „photochemische Synthese" erhaltenen Kohlenhydrate und ihren „labilen Formen". In ihrer Versuchsanordnung ist die photochemische Synthese mit der Formaldehydbildung beendet. Ob die Kondensationsgeschwindigkeit des Formaldehyds in Kalilauge durch die Bestrahlung beeinflußt wird, ist eine offene Frage, die nur durch exakte Messungen entschieden werden kann. Daß die Bildung der Zuckerarten in den Experimenten von Stoklasa und Zdobnický durch eine andere Wirkung bedingt ist, als durch den bekannten Einfluß der Kalilauge auf Formaldehyd, dafür ist auch nicht ein Versuch des Nachweises gebracht.

4. Schließlich: „Die Synthese des Zuckers aus Kaliumbicarbonat, das in Entstehung begriffen ist, und nascierendem Wasserstoff unter Einwirkung der ultravioletten Strahlen haben wir zuerst beobachtet, und die Resultate unserer diesbezüglichen Betrachtungen stehen bis jetzt allein da." Daß nach früheren Erfahrungen der molekulare Wasserstoff die Formaldehydsynthese mit Kohlensäure herbeiführt und daß nach meiner Ansicht auch bei Stoklasas und Zdobnickýs Versuchen die Reaktion im Gasraum, der übrigens auch einen wesentlichen Teil der wirksamen ultravioletten Strahlen absorbiert, verläuft, ist schon erwähnt. Das in Entstehung begriffene Kaliumbicarbonat versieht den Gasraum mit der erforderlichen Kohlensäure bereits durch seinen Kohlensäurepartialdruck; außerdem wird Kohlensäure dauernd hindurchgeleitet. Es wird also eine Schicht von Kohlensäure und Wasserstoffgas bestrahlt; darunter befindet sich die Flüssigkeit, die in freilich ziemlich komplizierter Weise die Gase liefert und die Eigenschaft hat, Formaldehyd in Kohlenhydrat zu verwandeln. Die Verfasser scheinen übrigens dem in Entstehung begriffenen Kaliumbicarbonat nicht durchgängig eine besondere Bedeutung zuzumessen;

---

[1]) Compt. rend. 150, 1169, 1327, 1517, 1690, 1910.

[2]) Zeitschr. f. Elektrochemie 12, 282, 1906.

[3]) Vgl. Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2551, 1905.

wenigstens sprechen sie in der Überschrift ausdrücklich von Kohlensäureanhydrid, das ist CO_2.

Aus diesen Darlegungen dürfte hervorgehen, daß die Arbeit von Stoklasa und Zdobnický keinerlei neue Tatsachen enthält, da sowohl die Bildung von Formaldehyd aus Kohlensäure und Wasser und Kohlensäure und Wasserstoff, wie auch die Umwandlung des Formaldehyds durch Alkalien in Zuckerarten bekannte Erscheinungen sind. Die von den Verfassern angenommene Neuheit einiger Beobachtungen, wie der Rolle des nascierenden Wasserstoffs und Kaliumbicarbonats und eines verschiedenen Verhaltens des Formaldehyds aus Kohlensäure und Wasser einerseits und Kohlensäure und Wasserstoff andrerseits in alkalischer Lösung gegenüber den ultravioletten Strahlen beruht meines Erachtens auf einer falschen Deutung der Versuche.

Christian Bohr †

Am 3. Februar 1911 ist Prof. Christian Bohr, der Direktor des Physiologischen Universitätsinstituts in Kopenhagen, gestorben. Trauernd steht nicht nur die dänische Wissenschaft am Grabe dieses ausgezeichneten Forschers, der in der ganzen physiologischen Welt, besonders aber in Deutschland, hochgeschätzt gewesen ist.

Bohr ist in Kopenhagen am 14. Februar 1855 geboren; er wurde 1872 Student und arbeitete schon seit 1874 im Laboratorium seines Vorgängers, Professor Panum. 1878 legte er das medizinische Examen ab und habilitierte sich bereits 1880; in den Jahren 1881 und 1883 arbeitete er bei Professor Ludwig in Leipzig, und als Professor Panum starb, wurde Bohr 1886 sein Nachfolger in der Stellung, die er bis zu seinem Tode so glänzend ausfüllte.

Nach seiner Berufung warf er sich mit seiner ganzen jugendlichen Kraft auf die experimentelle Laboratoriumarbeit und veröffentlichte in den folgenden Jahren eine Reihe Arbeiten von allergrößter Bedeutung, wie 1887: „Über die Kohlensäurebindung des Hämoglobins", 1889: „Über die Lungenrespiration" — wo er die Auffassung der Lunge als Drüse darlegte — und 1890 vier Abhandlungen über Sauerstoffbindungen des Blutes. Bohrs Fruchtbarkeit ist in diesen Jahren erstaunlich.

Wenn auch einige seiner Arbeiten aus diesen Jahren modifiziert worden sind, so unterliegt es doch keinem Zweifel und wird es gewiß auch von allen Seiten an-

erkannt, daß eben seine höchst originellen Forschungen den Anstoß zu einer großen Reihe Untersuchungen gegeben haben, die später von verschiedenen Seiten mit Rücksicht auf diese Fragen veröffentlicht wurden. In den folgenden Jahren veröffentlichte Bohr eine große Reihe Arbeiten, die seine Ideen auf diesem Gebiete ergänzen und weiter entwickeln und sich mit einer Reihe anderer, naheliegender Stoffe beschäftigen. Erwähnt seien noch seine im Verein mit Henriques ausgeführten Untersuchungen über die Verbrennung in den Lungen, eine Arbeit von größter Bedeutung, seine Untersuchungen über die Sauerstoffsekretionen in der Schwimmblase — eine selten elegante Arbeit — und seine Studien über den Stoffwechsel des Embryos. In seinen späteren Jahren widmete sich Bohr dem Studium der Vitalkapazität der Lungen unter verschiedenen Verhältnissen und begründete auf Basis seiner Untersuchungen eine ganz neue Betrachtung des Emphysems und dessen Bedeutung. Diese Arbeiten haben das größte Aufsehen erregt.

Bohr übte seine Lehrertätigkeit mit großer Gewissenhaftigkeit aus und ist stets bestrebt gewesen, die Unterrichtsverhältnisse in der Physiologie zu verbessern. Bohr hat eine ungewöhnlich große Anzahl Schüler gehabt, von denen die meisten sich später der Physiologie oder verwandten Fächern als ihrer Lebensaufgabe gewidmet haben; auch war er ein seltener Lehrer: stets zu helfen und zu unterstützen bereit.

Bohr war eine offene und mitteilsame Natur; er stand mit seinen Schülern auf einem vollständig kameradschaftlichen Fuß und ergriff jede Gelegenheit, die Aufgaben und Fragen, die ihn beschäftigten, mit ihnen zu besprechen. Die Anzahl der Arbeiten, die aus Bohrs Laboratorium hervorgingen, war groß. Sie behandeln hauptsächlich Fragen, die in näherer oder

fernerer Berührung mit den Aufgaben standen, die ihn wesentlich beschäftigten; ein Teil ist in dieser Zeitschrift veröffentlicht.

Als Mensch war Bohr feinfühlend, freundlich und hilfreich. Sein lebhaftes, gewinnendes Wesen und seine persönliche Liebenswürdigkeit verschafften ihm auch viele Freunde im Auslande. Sein Auftreten war einfach und bescheiden, mitunter beinahe verlegen. Er vermied am liebsten Streit — es ist daher charakteristisch, daß er kaum in eine wissenschaftliche Polemik verwickelt gewesen ist.

Mit seinen hervorragenden Kenntnissen auf dem speziellen Gebiete „des respiratorischen Stoffwechsels" verband er ein großes physikalisches und mathematisches Wissen. Auch hatte er viele Interessen außerhalb seines Berufes, er war ein Bewunderer und Kenner von Goethe und Holberg und hegte großes Interesse für Sport.

Bohr ist nur 55 Jahre alt geworden. Am 23. Februar hätte er seine 25jährige Anstellung bei der Universität feiern können, und seine Schüler und nordischen Kollegen beabsichtigten, an diesem Tage ihn mit einem Festbande zu feiern, der gerade jetzt in Leipzig gedruckt ist; — nun wird er leider den Charakter einer Erinnerungsschrift bekommen. Anscheinend war Bohr frisch und gesund; mitten in der Arbeit ereilte ihn ein sanfter Tod.

Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde, nebst Bemerkungen über den Stoffumsatz der Phosphorsäure und der Magnesia.

I. Mitteilung.

Von

Martin Kochmann.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 7. Februar 1911.)

Der Umstand, daß die Knochen der höheren Tiere und des Menschen zu einem sehr erheblichen Teil aus Kalksalzen bestehen, zeigt mit Deutlichkeit, daß diesen eine gewisse Bedeutung im Stoffwechsel zukommen muß. Aber es gibt auch sonst kein Organ, kein Gewebe und keine Zelle, die nicht Kalk in irgendeiner Form enthält. Es dürfte auch nicht zweifelhaft sein, daß diesem Kalk eine hohe physiologische Bedeutung zukommt, ja es ist vielleicht nicht mehr verwegen, den Gedanken auszusprechen, daß ohne Calciumionen eine normale Funktion der Zelle nicht möglich ist.

Trotz dieser augenscheinlichen Wichtigkeit des Kalks sind die Kenntnisse über seinen Stoffumsatz verhältnismäßig nur geringe. Zwar sind wir über Aufnahme und Resorption, sowie über die Ausscheidung hinreichend orientiert, wenn auch da noch vielfach Lücken bemerkbar sind, aber über den Bedarf des Organismus an diesem Mineralstoff herrschen die widersprechendsten Angaben.

Während auf der einen Seite Untersucher wie Dibbelt[1]) glauben, daß beim erwachsenen Hunde der Kalkbedarf so gering sei, daß selbst mit einer kalkarmen Nahrung die Tiere in kurzer Zeit ins Kalkgleichgewicht kommen, geben Forster[2]), E. Voit[3]), Fr. Müller[4]) u. a. an;

[1]) W. Dibbelt, Arbeit. a. d. pathol. Institut Tübingen 7, 144, 1909.

[2]) J. Forster, Zeitschr. f. Biol. 9, 297, 1873.

[3]) E. Voit, Zeitschr. f. Biol. 16, 93, 1880.

[4]) Fr. Müller, Zeitschr. f. Biol. 20, 327, 1884.

daß eine solche Nahrung das Kalkbedürfnis nicht zu befriedigen imstande sei. Auch die Angaben für den erwachsenen Menschen widersprechen sich in ähnlicher Weise. Bertram[1]) gibt den Minimalbedarf an Kalk mit 0,4 g CaO an, und Renvall[2]) kommt zu dem Ergebnis, daß 1,3 g CaO täglich Kalkgleichgewicht herstelle.

Dieser Unterschied in den Ansichten führt schon Albu und Neuberg in ihrer „Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels" zu der Meinung, daß „Art und Intensität des Kalkumsatzes außerordentlich stark abhängig sowohl von der Quantität wie von der Qualität der Nahrung sind". Wie man sich aber eine solche Abhängigkeit zu denken habe und ob eine solche tatsächlich bestehe, darüber geben die experimentellen Untersuchungen am erwachsenen Organismus keinen Aufschluß.

Erst in neuester Zeit haben Stoffwechseluntersuchungen am Säugling in dieser Hinsicht bemerkenswerte Ergebnisse gezeitigt. Rothberg[3]) konnte am kranken Säugling beobachten, daß die Vermehrung des Fettgehaltes der Nahrung die Kalkbilanz so schädlich beeinflussen kann, daß selbst negative Bilanzen zustande kommen. Birk[4]) konnte bezüglich des Verhaltens der Magnesia bei denselben Kindern ein gleiches konstatieren.

Auch die Kohlenhydrate, die zur Nahrung zugelegt werden, scheinen einen ähnlichen Einfluß auf den Kalkstoffwechsel der Säuglinge in den Versuchen von Rothberg und Birk auszuüben, wenn auch nur in schwachem Maße.

Beim nicht magendarmkranken Säugling wird in Stoffwechselversuchen L. F. Meyers[5]) durch die Zulage von Casein und Fett der Ansatz von Kalk und Phosphorsäure geringer; in einem Falle wird die Kalkbilanz sogar negativ.

In den Versuchen Freunds[6]) wird durch die Fettzulage die Ausscheidung des Kalks durch den Kot verringert. Bei dem einen Kind sank die Kalkausscheidung von 1,0305 g nach Zulage von Butter zur Nahrung auf 0,9713 g, und bei dem zweiten Kinde blieb sie annähernd gleich, wenigstens war die Verminderung nur sehr unbedeutend, 0,07 g CaO. In einer späteren Arbeit zeigt Freund[6]), daß bei Darreichung von Öl zwei Kinder ganz verschiedenes Verhalten bezüglich der Kalkretention aufweisen; das eine Kind zeigt Vermehrung, das andere Verschlechterung. Auch in den Versuchen von Steinitz[7]) blieb in den Sahneperioden, also bei fettreicher Nahrung, die Kalkbilanz bei zwei Kindern positiv, und wurde nur in einem Falle negativ. Die zusammen-

[1]) J. Bertram, Zeitschr. f. Biol. 14, 335, 1878.

[2]) G. Renvall, Skand. Arch. f. Phys. 16, 94, 1904.

[3]) O. Rothberg, Jahrb. f. Kinderheilk. 66, 1, 1907.

[4]) W. Birk, ebenda S. 300.

[5]) L. F. Meyer, Diese Zeitschr. 12, 422, 1908.

[6]) W. Freund, Jahrb. f. Kinderheilk. 61, 36, 1905 und diese Zeitschr. 16, 453, 1909.

[7]) F. Steinitz, Centralbl. f. inn. Med. 1904, 3.

fassenden Darstellungen L. F. Meyers und die klaren Ausführungen W. Freunds[1]) geben hierüber einen umfassenden Überblick.

So viel geht wohl aus diesen Ausführungen hervor, daß die Frage nach der Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten auch beim Säugling noch keineswegs geklärt ist.

Wie sich aber der erwachsene Organismus in dieser Hinsicht verhalten würde, ob mit anderen Worten bei diesem die organischen Nahrungskomponenten einen Einfluß auf die Kalkbilanz auszuüben vermögen, das ist meines Wissens bisher noch nicht der Gegenstand spezieller experimenteller Beobachtung gewesen, obwohl doch zahlreiche Versuche die Abhängigkeit der organischen Nahrungsstoffe voneinander behandelten. Um diese Lücke auszufüllen, sind die folgenden Untersuchungen unternommen worden.

Als Versuchstiere wurden Hunde gewählt. Sie wurden vor Beginn des Versuches längere Zeit mit gleichmäßigen Mengen von Sprattschem Hundekuchen ernährt und dann in einen großen runden Stoffwechselkäfig gesetzt, dessen Durchmesser 75 cm betrug. Die Tiere saßen im Käfig auf einem Drahtgitter, woran sie sich schnell gewöhnten, und was sie auch, ohne sichtbaren Schaden zu nehmen, gut ertrugen. Nur wenige Hunde waren so ungebärdig, daß sie vom Versuch abgesetzt werden mußten. Der Urin, den die Tiere ließen, floß über den trichterförmig geneigten Boden von verzinntem Eisenblech in einen Glaskolben. Der Kot, der in diesen Versuchen regelmäßig jeden Tag entleert wurde, blieb auf dem Drahtgitter liegen und wurde, wenn möglich, bald nach der Entleerung in eine Porzellanschale gebracht.

Sobald sich die Tiere an den Aufenthalt in dem Käfig gewöhnt hatten — die Käfige standen in einem hellen und luftigen Zimmer, das im Winter wohl geheizt und im Sommer kühl war —, wurde mit dem Versuch begonnen.

Der Kot wurde durch Zugabe von ungefähr 0,5 g Kohle zum Futter abgegrenzt, die aus Watte bereitet war und bis auf einen geringen, nicht wägbaren Rückstand verbrannte. Als Futter wurde den Tieren dieser Reihe während des Versuches Sprattscher Hundekuchen verabreicht, der im gepulverten Zustand erhältlich ist und im großen eingekauft wurde. Zu dem Futter wurden abgemessene Mengen destillierten Wassers zugesetzt, das Ganze wurde dann zu einem Brei verrührt und den Tieren frühmorgens auf einmal verabreicht. Die einzelnen Versuchsperioden waren verschieden lang, wie sich aus den Protokollen ergibt.

Im Futter sowohl, wie in den Ausscheidungen der Hunde Nr. 1 und 2 wurden die Mengen des Stickstoffs, Kalks und der Magnesia festgestellt. Bei Hund Nr. 3 wurde auch der Phosphorsäurestoffwechsel in den Kreis der Betrachtungen gezogen.

[1]) Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilkunde 1 und 3.

Bezüglich der analytischen Methoden sei folgendes erwähnt: Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. (Zerstörung der organischen Substanz mit reiner Schwefelsäure unter Zusatz von schwefelsaurem Kalium und Kupfer, Destillation des gebildeten Ammoniaks nach Zusatz von 25% Natronlauge und Auffangen des Ammoniaks in $^n/_{10}$-Schwefelsäure, deren Überschuß durch $^n/_{10}$-Natronlauge zurücktitriert wird.)

Die Bestimmung des Kalks geschah in 200 ccm des sauren, filtrierten Urins, der vor der Filtration durch Zusatz von Essigsäure noch angesäuert war, in der Weise, daß der Kalk durch Zusatz von Ammonoxalat als oxalsaurer Kalk gefällt, auf einem aschefreien Filter gesammelt und dann geglüht wurde, und schließlich als CaO zur Wägung gelangte. Im Filtrat wurde die Magnesia durch Zusatz von Ammoniak bei Gegenwart eines Überschusses von Phosphorsäure und Ammoniumchlorid als phosphorsaure Ammoniakmagnesia gefällt, geglüht und als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen.

Beim Hundekuchen und Kot wurden die Kalk- und Magnesiabestimmungen nach Veraschung der organischen Substanz im Muffelofen im wesentlichen in derselben Weise vorgenommen. Die Veraschung geschah zunächst bei sehr kleiner Flamme bis zur Verkohlung und beginnenden Veraschung; dann wurden zu der abgekühlten Asche einige Kubikzentimeter Salpetersäure hinzugefügt, diese auf dem Wasserbade oder bei sehr kleiner Flamme verdampft und nun die Veraschung mit großer Flamme im Muffelofen fortgesetzt und sehr schnell beendigt. Die Asche wurde in Salzsäure gelöst, die Salzsäure auf dem Wasserbade wieder verjagt, die unlöslich gewordene Kieselsäure und die Spur Kohle nach Aufnahme der Asche mit Salzsäure und heißem Wasser abfiltriert. Durch Zusatz von Ammoniak bis zur beginnenden Trübung, die durch Essigsäure zum Teil wieder zum Verschwinden gebracht war, wurde das Eisen als phosphorsaures Eisenoxyd gefällt und durch Erwärmen zu Flocken zusammengeballt, die abfiltriert werden konnten. Im Filtrat wurden dann Kalk und Magnesia analysiert. Beim dritten Hunde wurde auch die Phosphorsäure in der Nahrung und in den Ausscheidungen bestimmt, und zwar im Urin durch Titration mit Uranacetat unter Verwendung von Ferrocyankalium als Indicator genau nach den Angaben von Neubauer-Vogel, im Kot und Hundekuchen nach der Zerstörung der organischen Substanz nach der Neumannschen Methode, wobei ich genau nach den Anweisungen verfuhr, wie sie Aron im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden angegeben hat.[1])

Die Zahlen in den Tabellen sind stets das Mittel von zwei übereinstimmenden Analysen.

Die Nahrung hatte folgende Zusammensetzung:

Für Versuch Nr. 1 und 2: Gehalt an N 3,661%, an CaO 0,792%, an MgO 0,3715%.

---

[1]) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Berlin, Wien 1910.

Für Versuch Nr. 3 wurde neuer Hundekuchen gekauft, der eine andere Zusammensetzung hatte:

Gehalt an N 3,374%, P_2O_5 1,997%, CaO 1,1995%, MgO 0,416%.[1])

Es zeigt sich also, daß zwischen zwei zu verschiedenen Zeiten gekauften Proben zum Teil sehr wesentliche Unterschiede, besonders im CaO-Gehalt des Hundekuchens bestehen. Dagegen waren Veränderungen in der Zusammensetzung der einmal angeschafften Nahrung nicht zu konstatieren.

Tabelle I.

Hund Nr. 1.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	Urin: währ. der Periode ccm	Urin: täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	Kot: täglich g
1	28.—29. VI.	2	7050	200	500	—	705	352,5	370	185
2	30.VI.—1.VII.	2	7150	200	500	—	555	277,5	340	170

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i.d.Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i.d.Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge i.d.Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i.d.Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	2	9,626	4,813	3,902	1,951	13,528	6,764	71,2	28,8	14,644	7,322	+ 1,116	+ 0,558
2	2	9,277	4,639	4,173	2,086	13,450	6,725	69,0	31,0	14,644	7,322	+ 1,194	+ 0,597
						CaO-Stoffwechsel.							
1	2	0,224	0,112	3,930	1,965	4,154	2,077	5,4	94,6	3,168	1,584	− 0,986	− 0,493
2	2	0,278	0,139	5,744	2,872	6,022	3,011	4,6	95,4	3,168	1,584	− 2,854	− 1,427
						MgO-Stoffwechsel.							
1	2	0,181	0,090	1,258	0,629	1,439	0,719	12,6	87,4	1,486	0,743	+ 0,047	+ 0,024
2	2	0,251	0,125	1,156	0,578	1,407	0,703	17,8	82,2	1,486	0,743	+ 0,079	+ 0,040

Dieser Versuch diente gewissermaßen als Vorversuch und war demgemäß von verhältnismäßig kurzer Dauer. Das Tier wurde 11 Tage vor Beginn des eigentlichen Versuchs, am 17. VI.

[1]) Aus diesen Zahlen läßt sich die Verteilung der Phosphorsäure mit großer Wahrscheinlichkeit entnehmen:

P_2O_5 an N gebunden (im Fleisch im Verhältnis 1:7,5)	0,490 g
P_2O_5 an CaO gebunden (CaO : P_2O_5 = 168:142)	1,014 „
P_2O_5 an MgO gebunden (MgO : P_2O_5 = 140:142) . . .	0,492 „
Demnach berechnet	1,996 g P_2O_5
Gefunden	1,997 g

Außer im Eiweiß findet sich die Phosphorsäure also wahrscheinlich als Tricalcium- und Magnesiumphosphat in der verfütterten Nahrung.

in den Käfig gebracht. Sein Gewicht betrug 7600 g. Nachdem es 4 Tage 150 g Hundekuchen und 500 g Wasser erhalten hatte, wurden ihm 50 g Hundekuchen zugelegt, da sein Körpergewicht abnahm. 7 Tage wurde der Hund dann noch vor Beginn des Versuchs bei 200 g Hundekuchen und der gleichen Wassermenge wie vorher im Käfig gehalten. Am 22. VI. begann der 4tägige Versuch, bei dem es sich zeigte, daß das nunmehr 7050 g schwere Tier bei der gereichten Nahrung an Körpergewicht zunahm, und zwar in der 2tägigen Periode um 100 g. Es retinierte Stickstoff, und zwar 0,597 g pro die, was ungefähr 3,75 g Körpereiweiß entsprechen würde. Auffallend sind die hohen Stickstoffzahlen im Kot, in dem während der ersten Periode 29% des ausgeschiedenen Stickstoffs sich vorfinden. In der zweiten Periode erscheinen sogar 31% N in den Faeces. Die Resorption und Ausnutzung des Stickstoffs im Hundekuchen ist also eine außerordentlich schlechte.

Der Kalkgehalt der Nahrung ist ein sehr hoher; selbst das kalkreichste Nahrungsmittel, das wir aufnehmen könnten, die Kuhmilch, steht weit zurück, denn ihr Kalkgehalt beträgt nur 1,6 g CaO im Liter. Diese Tatsache und der Umstand, daß der Organismus bei Ansatz von Eiweiß sicherlich auch Salze, also auch CaO gebraucht, würden die Erwartung rechtfertigen, daß der Hund Kalk ansetzen oder retinieren würde. Die Tabelle aber zeigt uns, daß mehr Kalk ausgeschieden wird, als eingenommen ist. In den ersten beiden Tagen werden täglich 0,493 g und in der zweiten Periode sogar 1,427 g CaO zuviel ausgeschieden.

Im Gegensatz dazu stehen die Magnesiabilanzen, die in beiden Perioden eine Retention aufweisen.

Wenn wir aus den angegebenen Analysenzahlen für das eigentümliche Verhalten der Kalkbilanzen eine Erklärung ausfindig machen wollen, so müssen wir die Zahlen untereinander in einen gewissen Zusammenhang bringen. In der zweiten Periode ist die „Negativität" der CaO-Bilanz noch größer geworden als vorher, und daran ist besonders der Kot beteiligt. Eine einfache Überlegung führt zu der Frage: Welche von den untersuchten Bestandteilen des Kotes haben gleichfalls eine Vermehrung erfahren? Die Menge des frischen Kotes ist es nicht. Vielleicht hat die Trockensubstanz zugenommen. Es ist dies

bei der regelmäßigen Entleerung der Faeces nicht anzunehmen, aber mit Sicherheit kann ich darüber keinen Aufschluß geben, da die Analysen immer im frischen Kot vorgenommen und Trockenbestimmungen deshalb nicht gemacht wurden. Wir sehen auch, daß der Stickstoffgehalt des Kotes absolut wie auch relativ zugenommen hat. Die Differenzen zwischen der ersten und zweiten Periode sind aber denn doch zu geringfügig, um die großen Veränderungen des Kotkalks und der Bilanz zu erklären.

Weiter sehen wir, daß der größte Teil des Kalks, was ja schon längst bekannt ist, durch den Kot ausgeschieden wird, und nur 5,4 und 5,6% verlassen den Körper durch den Urin.

Auch bei der Magnesia sind die durch den Kot ausgeschiedenen Mengen größer als die, welche durch den Harn eliminiert werden. Immerhin sind letztere doch erheblicher und betragen in der Periode 1 12,5 und in der Periode 2 sogar 17,8% der ausgeschiedenen Gesamtmenge. Dabei fällt noch besonders auf, daß während die durch den Urin eliminierte Kalkmenge in der zweiten Periode kleiner ist als in der ersten, bei der Magnesia gerade das Umgekehrte eingetreten ist.

Schon aus diesem kurzen Versuch ersehen wir, daß trotz der sehr kalkreichen Nahrung die Kalkbilanz negativ ist und sogar den Wert von 3,84 g CaO in 4 Tagen erreicht. Wenn man nicht annehmen will, daß aus irgendeinem Grunde plötzlich Kalk, der irgendwie aus der Vorperiode im Darm liegen geblieben ist — bei der gleichen Nahrung und der guten Abgrenzung des Kotes eine sehr unwahrscheinliche Annahme — nunmehr ausgeschieden wird, so muß man schon zugeben, daß diese große Kalkmenge aus den Organen des Hundes stammt. 3,84 g CaO ist viel mehr als die Gesamtmenge des Kalks in allen Organen zusammen mit Ausnahme der Knochen. Es ist also nur logisch, wenn ich behaupte, daß mindestens 3,0 g CaO vom Skelettsystem abgegeben worden sind. Der fertige Knochen enthält aber ungefähr 16% Kalk, mithin hätte das Tier nach dieser Berechnung ungefähr 19 g Knochensubstanz in 4 Tagen eingebüßt. Nach meinen Untersuchungen beträgt der CaO-Gehalt eines Hundes am Ende der Lactationsperiode etwas weniger als 2%. Nehmen wir für den erwachsenen Hund sogar einen Kalkgehalt von 2% an, so würde der 7 kg schwere

Hund im ganzen 140 g CaO besitzen. Mindestens 98 % davon entfallen auf das Skelettsystem, und nur 2 % = 2,8 g auf die übrigen Organe des Körpers. Albu und Neuberg (l. c.) geben sogar an, daß 99 % des Gesamtkalkgehaltes dem Skelettsystem und nur 1 % den übrigen Organen zukomme.

Diese Verhältnisse schienen so eigenartig zu sein, daß ich an einem Hund von ungefähr gleichem Körpergewicht einen weiteren Versuch anstellte, der unter denselben äußeren Bedingungen verlaufen sollte und vom 23. VII. bis zum 26. VIII., also 35 Tage währte. Die Ergebnisse lassen sich aus der Übersichtstabelle II entnehmen.

Der Versuch scheidet sich in zwei Teile, da das Versuchstier bis zum 18. VIII. nur 200 g Hundekuchen erhielt, später aber eine Fettzulage bekam, für die allerdings die Menge des Hundekuchens verringert wurde.

Im ersten Teil des Versuches verlor das Tier an Körpergewicht, das von 6500 g auf 6230 g zurückging. Trotzdem sehen wir, daß es Stickstoff retinierte, und zwar nicht unerheblich, nämlich 24,232 g N. Das entspräche aber 151,5 g Eiweiß. Jedenfalls muß das Tier, auch wenn der retinierte Stickstoff nicht organisiert worden ist, Fett oder Wasser, oder beides verloren haben. Der Wasserverlust war aber jedenfalls nicht durch eine vermehrte Diurese bedingt, wie sich aus den Tabellen ergibt.

Tabelle II.

Hund Nr. 2.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	Urin: währ. der Periode ccm	täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	täglich g
1	23.–24. VII.	2	6500	200	500	—	550	275	235	117,5
2	25.–26. VII.	2	6400	200	500	—	760	380	325	162,5
3	27.–28. VII.	2	6450	200	500	—	450	225	430	215
4	29.–31. VII.	3	6400	200	500	—	735	245	445	148,3
5	1.–3. VIII.	3	6530	200	500	—	780	260	425	141,7
6	4.–5. VIII.	2	6335	200	500	—	585	292,5	430	215
7	6.–8. VIII.	3	6350	200	500	—	675	225	450	150
8	9.–10. VIII.	3	6385	200	500	—	765	255	480	160
9	12.–14. VIII.	3	6230	200	500	—	665	221,7	400	133,3
10	17.–19. VIII.	3	6200	180	500	90	690	230	485	161,7
11	20.–22. VIII.	3	6250	180	500	90	625	208,3	395	131,7
12	23.–26. VIII.	4	6450	180	500	30	710	177,5	595	149

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung durch Urin i. d. Periode g	Ausscheidung durch Urin täglich g	Ausscheidung durch Kot i. d. Periode g	Ausscheidung durch Kot täglich g	Gesamtmenge i. d. Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i. d. Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	2	7,584	3,792	3,076	1,538	10,660	5,330	71,1	28,9	14,644	7,322	+ 3,984	+ 1,992
2	2	10,618	5,309	3,981	1,990	14,599	7,299	72,7	27,3	14,644	7,322	+ 0,045	+ 0,023
3	2	7,029	3,515	4,816	2,408	11,845	5,923	59,3	40,7	14,644	7,322	+ 2,739	+ 1,399
4	3	13,324	4,441	4,461	1,487	17,785	5,928	74,9	25,1	21,966	7,322	+ 4,181	+ 1,394
5	3	12,510	4,170	4,572	1,524	17,082	5,694	73,2	26,8	21,966	7,322	+ 4,884	+ 1,628
6	2	9,774	4,887	5,237	2,619	15,011	7,506	65,1	34,9	14,644	7,322	− 0,367	− 0,184
7	3	12,967	4,322	5,355	1,785	18,322	6,107	70,8	29,2	21,966	7,322	+ 3,644	+ 1,215
8	3	13,938	4,646	6,000	2,000	19,938	6,646	69,9	30,1	21,966	7,322	+ 2,028	+ 0,676
9	3	14,062	4,687	4,872	1,624	18,934	6,311	74,3	25,7	21,966	7,322	+ 3,032	+ 1,011
10	3	14,307	4,769	5,432	1,811	19,739	6,580	72,5	27,5	19,769	6,590	+ 0,030	+ 0,010
11	3	14,587	4,862	5,143	1,714	19,730	6,576	73,9	26,1	19,769	6,590	+ 0,039	+ 0,014
12	4	17,186	4,297	6,914	1,728	24,100	6,025	79,6	20,4	26,359	6,590	+ 2,259	+ 0,565
						Ca-O-Stoffwechsel.							
1	2	0,060	0,030	3,175	1,587	3,235	1,617	1,9	98,1	3,168	1,584	− 0,067	− 0,033
2	2	0,086	0,043	4,147	2,074	4,233	2,117	2,0	98,0	3,168	1,584	− 1,065	− 0,533
3	2	0,100	0,050	4,007	2,003	4,107	2,053	2,5	97,5	3,168	1,584	− 0,939	− 0,469
4	3	0,240	0,080	4,299	1,433	4,539	1,513	5,6	94,4	4,752	1,584	+ 0,213	+ 0,071
5	3	0,143	0,048	4,472	1,491	4,615	1,539	3,2	96,8	4,752	1,584	+ 0,137	+ 0,045
6	2	0,161	0,081	4,227	2,113	4,388	2,194	3,8	96,2	3,168	1,584	− 1,220	− 0,610
7	3	0,178	0,059	4,776	1,592	4,954	1,651	3,7	96,3	4,752	1,584	− 0,202	− 0,067
8	3	0,099	0,033	6,333	2,111	6,432	2,144	1,6	98,4	4,752	1,584	− 1,680	− 0,560
9	3	0,227	0,076	4,444	1,481	4,671	1,557	5,1	94,9	4,752	1,584	+ 0,081	+ 0,027
10	3	0,136	0,045	5,744	1,915	5,880	1,960	2,4	97,6	4,277	1,426	− 1,603	− 0,534
11	3	0,070	0,023	6,101	2,034	6,171	2,057	1,1	98,9	4,277	1,426	− 1,894	− 0,631
12	4	0,043	0,011	8,202	2,051	8,245	2,062	0,5	99,5	5,702	1,426	− 2,543	− 0,636
						MgO-Stoffwechsel.							
1	2	0,158	0,079	1,449	0,725	1,607	0,804	9,8	90,2	1,486	0,743	− 0,121	− 0,061
2	2	0,209	0,105	1,484	0,742	1,693	0,847	12,3	87,7	1,486	0,743	− 0,207	− 0,104
3	2	0,193	0,096	1,706	0,853	1,899	0,949	10,2	89,8	1,486	0,743	− 0,413	− 0,206
4	3	0,346	0,115	1,706	0,569	2,052	0,684	16,9	83,1	2,230	0,743	+ 0,178	+ 0,059
5	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	2	0,271	0,136	1,247	0,623	1,518	0,759	17,9	82,1	1,486	0,743	− 0,032	− 0,016
7	3	0,309	0,103	1,680	0,560	1,989	0,663	15,5	84,5	2,230	0,743	+ 0,241	+ 0,080
8	3	0,278	0,093	2,288	0,763	2,566	0,856	10,8	89,2	2,230	0,743	− 0,336	− 0,113
9	3	0,411	0,137	1,573	0,524	1,984	0,661	20,7	79,3	2,230	0,743	+ 0,246	+ 0,082
10	3	0,348	0,116	1,843	0,614	2,191	0,730	15,9	84,1	2,007	0,669	− 0,184	− 0,061
11	3	0,035	0,012	1,471	0,490	1,506	0,502	2,3	97,7	2,007	0,669	+ 0,501	+ 0,163
12	4	0,048	0,012	2,454	0,614	2,502	0,626	1,9	98,1	2,676	0,669	+ 0,174	+ 0,047

Besonders interessant ist der Vergleich des N-Stoffwechsels mit dem des Kalks: Während der Zeit vom 23. VII. bis 14. VIII. hat das Tier nämlich 4,642 g CaO verloren. Nach unserer früheren Rechnung würde das 6,5 kg schwere Tier bei einem Kalkgehalt von 2% im ganzen nur 130 g CaO besessen haben. Da

die Weichteile nur 1 bis 2% des Gesamtkalkgehaltes für sich in Anspruch nehmen, so muß auch hier eine Einschmelzung des Knochengewebes stattgefunden haben, ja es ist sogar angängig, den Gesamtverlust auf das Skelettsystem zu beziehen, da wir aus den Untersuchungen von Aron[1]) wissen, daß die Weichteile den Kalk nur sehr schwer abgeben. Während der ersten 23 Tage hat also das Tier ungefähr 3,5% des Gesamtkalkgehalts seines Knochensystems hergeben müssen.

Die Frage nach dem Grunde dieses Kalkverlustes kann bis zu einem gewissen Grade durch einen Vergleich der einzelnen Zahlen der Tabelle beantwortet werden: Es ist gar kein Zweifel, daß die Größe der Stickstoffretention in den einzelnen Perioden des Versuches einen Einfluß auf die Kalkbilanz erkennen läßt. Wird die Retention des Stickstoffs nämlich eine große, so vermindert sich der Kalkverlust. Daß dabei aber zwischen Stickstoff und Kalk kein umgekehrt proportionales Verhältnis herrscht, versteht sich eigentlich von selbst; immerhin ist es doch ganz deutlich, daß in den Perioden mit hohem Stickstoffansatz die Kalkverluste geringer werden und die Kalkbilanz sogar positiv werden kann. Das einzige Mal, wo die N-Bilanz negativ ist, zeigt auch die Kalkbilanz den größten negativen Wert. In der dritten Periode findet sich gleichfalls eine ziemlich starke Stickstoffretention, aber trotzdessen ist der Kalkverlust erheblich. Vergleichen wir allerdings die Zahlen mit denen der Periode Nr. 2, so ergibt sich auch hier eine Besserung der Kalkbilanz (s. auch die N-Menge im Kot). Nach meinem Dafürhalten ist also aus diesen Zahlen ein deutlicher Einfluß der Stickstoffretention auf die Kalkbilanz zu konstatieren. Es scheint, als brauche der retinierte Stickstoff Kalk, vielleicht zu seiner Organisation.

Ebenso sicher ist es aber auch, daß neben dieser Abhängigkeit von der Stickstoffbilanz noch ein anderer Faktor die Kalkbilanz beeinflußt, da es sonst unmöglich wäre, daß überhaupt Kalkverluste eintreten, die bei ungefährem Stickstoffgleichgewicht über 0,5 g täglich betragen.

Besser als in dem vorigen Versuch sehen wir bei diesem zweiten, daß in Perioden starken Kalkverlustes die Stickstoff-

---

[1]) H. Aron, diese Zeitschr. 12, 28, 1908.

zahlen im Kot verhältnismäßig große sind, so daß eine Abhängigkeit von der Größe des Kotstickstoffs nicht ganz ausgeschlossen erscheint. Daß es sich aber nicht etwa um eine mangelhafte Resorption von Nahrungskalk handelt, läßt sich aus der Höhe der Kotkalkzahlen ohne weiteres entnehmen. Es ist natürlich auch leicht möglich, daß nicht der Kotstickstoff diesen Einfluß ausübt, sondern irgend eine andere Substanz im Kot, die mit der Stickstoffmenge einigermaßen parallel geht. Ich glaube, daß es vorderhand am besten ist zu sagen, daß irgend eine aus der Nahrung stammende Schädigung auf den Kalkstoffwechsel im ungünstigen Sinne einwirke. Wenn es auch nicht möglich ist, diese beiden Faktoren, welche den Kalkstoffwechsel beeinflussen, zahlenmäßig zum Ausdruck zu bringen, so ergibt sich doch aus diesen Versuchen, daß tatsächlich die Kalkbilanz von zwei Komponenten abhängig ist. Bei negativer Stickstoffbilanz addieren sich diese und schädigen den Kalkstoffwechsel, bei positiver Stickstoffbilanz wird die „Nahrungsschädigung" zum Teil oder gänzlich übertönt.

In dem zweiten Teil des Versuches, der 2 Tage nach Beendigung des ersten fortgesetzt wird, ohne daß der Hund den Käfig verlassen oder eine andere Nahrung bekommen hätte, werden dem Tiere 180 g Hundekuchen, 500 ccm Wasser und 90 bzw. 30 g Schweinefett gereicht.

Wir sehen in diesen Perioden das Körpergewicht innerhalb 10 Tagen um 250 g steigen. Die Diurese bleibt im wesentlichen unverändert, die Menge des frischen Kotes schwankt in den gewöhnlichen Grenzen. Die Stickstoffbilanz bleibt positiv, obwohl etwas weniger Stickstoff im Futter gereicht wird, und steigt von 0,010 g auf 0,565 g täglich. In der ersten Fettperiode wird ungefähr ebenso viel Stickstoff angesetzt wie in der Periode Nr. 2, und demgemäß ist die Kalkbilanz dieselbe. Aber schon in der zweiten Fettperiode wird die Kalkbilanz stärker negativ, und in der dritten Periode erreicht die Kalkbilanz negative Werte, die größer sind als selbst bei gleichzeitigem Stickstoff*verlust*. Dies kann aber nur einem Einfluß zu danken sein, der gleichzeitig die Stickstoffbilanz bessert. Mit Notwendigkeit werden wir auf das Fett der Nahrung gewiesen, das wir als Ursache annehmen können. Dabei ist es auffallend, daß die durch den *Urin* ausgeschiedene Kalkmenge immer kleiner

wird und schließlich den kleinsten, in diesem Versuch beobachteten Wert erreicht, während die Kotwerte dementsprechend steigen, so daß in der letzten Periode 95,5% der gesamten Kalkmenge durch die Faeces ausgeschieden werden.

Es hat also ganz den Anschein, als ob das Fett zwar den Ansatz des Stickstoffs begünstigt, die Kalkbilanz aber im negativen Sinne beeinflußt, und zwar dadurch, daß besonders die Kalkausscheidung im Kot erhöht wird; dieser ungünstige Einfluß des Fettes ist so stark, daß er sogar die Wirkung der Stickstoffretention überwiegt. Eine Erklärung dieser merkwürdigen Tatsachen soll später versucht werden.

Von dem Magnesiastoffwechsel kann man sich in diesen Versuchen kein klares Bild machen. Bald hat man den Eindruck, daß er sich dem Kalkstoffwechsel anschließe, bald wieder dem des Stickstoffs. Das stimmt auch mit den schwankenden Angaben in der Literatur überein. Während beispielsweise Birk (l. c.) beim magendarmkranken Säugling zeigen konnte, daß sich die Magnesia wie der Kalk verhalte, kommen wieder andere, wie Gottstein[1]), durch Versuche am Tier zu der Überzeugung, daß die Magnesia mit dem Stickstoff parallel geht. Auffallend ist die Tatsache, daß in den Fettperioden sich auch die durch den Urin ausgeschiedene Menge der Magnesia verringert; denn während sonst im Durchschnitt etwa 10 bis 20% der Magnesia durch den Urin eliminiert werden, ist der Anteil der Urinmagnesia in der dritten Fettperiode nur noch 1,9% der Gesamtmenge.

In einem dritten Versuch (Tab. III) war beabsichtigt, die Futtermengen zu verändern und unter diesen Umständen die einzelnen Ausscheidungen zu untersuchen. Gleichzeitig wurde in diesem Versuch auch die Phosphorsäurebilanz aufgestellt.

Es werden dem Hunde zunächst nur 100 g Hundekuchen und 300 ccm destilliertes Wasser gereicht. Diese Nahrung ist eine ungenügende, und demgemäß zerfällt stickstoffhaltige Körpersubstanz; die N-Bilanz ist mit — 2,120 g pro Tag stark negativ. Das Körpergewicht nimmt in dieser Periode um 150 g ab, der Stickstoffverlust von 8,497 g würde 51 g Muskelsubstanz entsprechen. Auch die Phosphorsäure-, Kalk- und Magnesiabilanz

[1]) E. Gottstein, Inaug.-Diss., Breslau 1901.

Tabelle III.

Hund Nr. 3.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	Urin: währ. der Periode ccm	Urin: täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	Kot: täglich g
1	5.—8. X.	4	6750	100	300	—	1155	288,8	220	55
2	9.—13. X.	5	6600	150	300	—	1130	226	410	82
	14.—18. X.									
3	15.—21. X.	3	6450	150	300	—	640	213,3	270	90
4	22.—26. X.	5	6280	150	300	—	1075	215	455	91
5	27.—31. X.	5	6260	175	300	—	850	170	380	76
6	1.—5. XI.	5	6320	175	300	—	905	181	605	121
7	6.—11. XI.	6	6355	200	300	—	925	154,2	561	93,5
8	12.—16. XI.	5	6420	200	300	—	770	154	624	120,8
9	17.—21. XI.	5	6460	200	300	—	740	148	574	114,8
10	22.—26. XI.	5	6300	200	300	—	755	151	555	111
11	27.XI.—1.XII.	5	6350	200	300	—	725	145	550	110
12	2.—6. XII.	5	6540	200	300	—	910	182	505	101

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i. d. Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i. d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge i. d. Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i. d. Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
		N-Stoffwechsel.											
1	4	19,255	4,814	3,896	0,974	23,151	5,788	83,2	16,8	14,672	3,668	— 8,479	— 2,120
2	5	24,595	4,919	6,630	1,326	31,225	6,245	73,1	26,9	27,510	5,502	— 3,715	— 0,743
2a	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	3	15,222	5,074	4,120	1,373	19,342	6,447	72,9	27,1	16,506	5,502	— 2,836	— 0,945
4	5	23,750	4,750	7,171	1,434	30,921	6,184	80,0	20,0	27,510	5,502	— 3,411	— 0,682
5	5	25,200	5,040	6,923	1,385	32,123	6,425	80,0	20,0	32,095	6,419	— 0,028	— 0,006
6	5	24,864	4,973	9,262	1,852	34,126	6,825	62,7	37,3	32,095	6,419	— 2,031	— 0,406
7	6	27,888	4,648	9,153	1,525	37,041	6,173	67,2	32,8	44,016	7,336	+ 6,975	+ 1,163
8	5	24,780	4,956	10,474	2,095	35,254	7,051	57,7	42,3	33,740	6,748	— 1,514	— 0,303
9	5	26,488	5,298	8,692	1,738	35,180	7,036	67,2	32,8	33,740	6,748	— 1,440	— 0,288
10	5	26,488	5,298	8,547	1,709	35,035	7,007	67,7	32,3	33,740	6,748	— 1,295	— 0,259
11	5	23,408	4,682	7,888	1,578	31,296	6,260	66,3	33,7	33,740	6,748	+ 2,444	+ 0,488
12	5	25,795	5,159	6,378	1,276	32,173	6,435	75,3	24,7	33,740	6,748	+ 1,567	+ 0,313
		P_2O_5-Stoffwechsel.											
1	4	4,634	1,159	5,302	1,325	9,936	2,484	46,6	53,4	8,762	2,191	— 1,174	— 0,293
2	5	6,002	1,200	9,686	1,937	15,688	3,137	38,3	61,7	3,286	3,286	+ 0,741	+ 0,149
3	3	3,728	1,243	6,311	2,104	10,040	3,347	37,1	62,9	9,857	3,286	— 0,132	— 0,061
4	5	6,060	1,212	11,312	2,262	17,372	3,474	34,9	65,1	16,429	3,286	— 0,943	— 0,188
5	5	6,096	1,219	10,191	2,038	16,287	3,257	37,4	62,6	19,167	3,833	+ 2,880	+ 0,576
6	5	6,523	1,305	12,511	2,502	19,034	3,807	34,3	65,7	19,167	3,834	+ 0,133	+ 0,027
7	6	7,500	1,250	13,503	2,251	21,003	3,501	35,7	64,3	26,286	4,381	+ 5,283	+ 0,880
8	5	6,500	1,300	12,334	2,467	18,834	3,767	34,5	65,5	19,971	3,994	+ 1,137	+ 0,227
9	5	5,368	1,074	14,539	2,908	19,907	3,982	27,0	73,0	19,971	3,994	+ 0,064	+ 0,012
10	5	5,280	1,056	14,075	2,815	19,355	3,871	27,3	72,7	19,971	3,994	+ 0,616	+ 0,123
11	5	5,082	1,016	10,950	2,190	16,032	3,206	31,7	68,3	19,971	3,994	+ 3,939	+ 0,788
12	5	5,425	1,085	10,100	2,020	15,525	3,105	34,9	65,1	19,971	3,994	+ 4,446	+ 0,889

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung durch Urin i.d.Periode g	Ausscheidung durch Urin täglich g	Ausscheidung durch Kot i.d.Periode g	Ausscheidung durch Kot täglich g	Gesamtmenge i.d.Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i.d.Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
						CaO-Stoffwechsel.							
1	4	0,067	0,017	4,472	1,118	4,539	1,135	1,5	98,5	4,111	1,028	− 0,428	− 0,107
2	5	0,081	0,016	7,334	1,467	7,415	1,483	1,1	98,9	7,709	1,542	+ 0,294	+ 0,059
3	3	0,047	0,016	4,408	1,469	4,455	1,485	1,1	98,9	4,625	1,542	+ 0,170	+ 0,057
4	5	0,068	0,014	8,009	1,602	8,077	1,616	0,9	99,1	7,709	1,542	− 0,368	− 0,074
5	5	0,072	0,014	7,191	1,438	7,263	1,452	1,0	99,0	8,993	1,799	+ 1,730	+ 0,347
6	5	0,060	0,012	10,288	2,058	10,348	2,070	0,6	99,4	8,993	1,799	− 1,355	− 0,271
7	6	0,061	0,010	9,658	1,610	9,719	1,620	0,6	99,4	12,334	2,056	+ 2,615	+ 0,436
8	5	0,048	0,010	11,025	2,205	11,073	2,215	0,5	99,5	11,995	2,399	+ 0,922	+ 0,184
9	5	0,048	0,010	12,532	2,506	12,580	2,516	0,4	99,6	11,995	2,399	− 0,585	− 0,117
10	5	0,034	0,007	12,804	2,561	12,838	2,568	0,3	99,7	11,995	2,399	− 0,843	− 0,169
11	5	0,029	0,006	11,760	2,352	11,789	2,358	0,3	99,7	11,995	2,399	+ 0,206	+ 0,041
12	5	0,046	0,009	10,760	2,152	10,806	2,161	0,4	99,6	11,995	2,399	+ 1,189	+ 0,238
						MgO-Stoffwechsel.							
1	4	0,321	0,080	1,370	0,343	1,691	0,423	18,9	81,1	1,495	0,374	− 0,196	− 0,049
2	5	0,056	0,011	2,204	0,441	2,260	0,452	2,4	97,6	2,804	0,561	+ 0,544	+ 0,109
3	3	0,037	0,012	1,443	0,481	1,480	0,493	2,4	97,6	1,682	0,561	+ 0,202	+ 0,068
4	5	0,117	0,023	2,588	0,518	2,706	0,541	4,3	95,7	2,804	0,561	+ 0,098	+ 0,020
5	5	0,050	0,010	2,451	0,490	2,501	0,500	2,0	98,0	3,271	0,654	+ 0,770	+ 0,154
6	5	0,080	0,016	3,521	0,704	3,601	0,720	2,2	97,8	3,271	0,654	− 0,330	− 0,066
7	6	0,050	0,008	3,238	0,540	3,288	0,548	1,5	98,5	4,486	0,748	+ 1,198	+ 0,200
8	5	0,038	0,008	3,926	0,785	3,964	0,793	1,0	99,0	4,158	0,832	+ 0,194	+ 0,039
9	5	0,026	0,005	3,869	0,774	3,895	0,779	0,6	99,4	4,158	0,832	+ 0,263	+ 0,053
0	5	0,052	0,010	4,038	0,808	4,090	0,818	1,2	98,8	4,158	0,832	+ 0,068	+ 0,014
11	5	0,124	0,025	3,479	0,696	3,603	0,721	3,5	96,5	4,158	0,832	+ 0,555	+ 0,111
12	5	0,309	0,062	3,522	0,704	3,831	0,766	8,1	91,9	4,158	0,832	+ 0,327	+ 0,066

sind negativ, trotz der sehr erheblichen Einnahme an diesen Substanzen, die eigentlich genügen müßte, Gleichgewicht herzustellen. In der nächsten Periode werden 150 g Hundekuchen verfüttert; die Stickstoffbilanz bleibt immer noch negativ, beträgt aber nur noch ein Drittel der ersten Periode. Man müßte jetzt erwarten, daß in der Kalkbilanz ein starkes Plus auftreten würde, daß wenigstens die in dieser Periode mehr eingeführte Menge von 0,5 g CaO zum Ansatz kommt. Die Bilanz wird in der Tat positiv, aber doch nur in sehr geringem Grade. Die Verhältnisse im Magnesiastoffwechsel sind bessere; hier gelangt nahezu ein Fünftel der eingeführten Menge zum Ansatz. Die Phosphorsäurebilanz müßte in dieser Periode eigentlich negativ sein, wenn sie nur mit dem Stickstoff parallel gehen würde. Sie ist aber positiv, und man gewinnt schon dadurch

den sicheren Eindruck, daß ihre Bilanz auch vom Kalk und der Magnesia abhängig ist. Jedenfalls ist es zweifellos, daß die phosphorsaure Magnesia und der phosphorsaure Kalk der Nahrung resorbiert werden können, denn sonst wäre eine positive Bilanz nicht möglich.

Wenn die einzelnen Werte nach der früheren Analyse des Hundekuchens rechnerisch miteinander verglichen werden, so ergibt sich folgendes: Mit dem Stickstoffverlust von 0,743 g werden, da im Fleisch des Hundekuchens das Verhältnis $N:P_2O_5$ wie 7,5:1 ist, 0,099 g P_2O_5 zu Verlust gehen.

Den angesetzten 0,059 g CaO entsprechen . .	0,050 g P_2O_5
und den 0,109 g MgO entsprechen	0,110 g P_2O_5
zusammen	0,160 g P_2O_5
Durch den N-Verlust bedingt	— 0,099 g P_2O_5
Mithin hätten angesetzt werden müssen . .	+ 0,061 g P_2O_5

Die gefundenen Werte stimmen mit den berechneten nicht so überein, wie es theoretisch denkbar wäre. Immerhin ist die Abhängigkeit vom Stickstoff einerseits und der MgO- und CaO-Bilanz andererseits nicht zu verkennen.

Auch in der dritten Periode liegen die Verhältnisse ähnlich. Die Stickstoffbilanz ist etwas stärker negativ als in der Periode Nr. 2, die Kalk- und Magnesiabilanz dagegen positiv, letztere aber schwächer als in der vorhergehenden Periode; die Folge ist eine leicht negative P_2O_5-Bilanz.

Von einer stark in die Augen fallenden Abhängigkeit des Kalks von der Stickstoffbilanz einerseits und einem zweiten Faktor, der in der Nahrung begründet ist und einen schädigenden Einfluß auf die Kalkbilanz ausübt, sind in diesem Versuch demnach nur Andeutungen vorhanden, wie es auch aus den Zahlen der übrigen Perioden dieses Versuches zu entnehmen ist.

Das findet in einem Vergleich der Kalkmengen mit denen des Stickstoffs in der Nahrung seine Erklärung. Die Mengen des Kalks sind in dieser Versuchsreihe so enorm groß — sie verhalten sich zum Stickstoff wie 1:3 —, daß eben dieser schädigende „Nahrungsfaktor" nicht zum Vorschein kommen kann, da die Kalkmenge eigentlich den weitgehendsten Forderungen genügt.

Durch dieses Moment ist es bedingt, daß die Aufgabe, den Einfluß der Nahrungsmengen auf den Kalk-, Magnesia- und

Phosphorsäurestoffwechsel einer Untersuchung zu unterziehen, durch diesen Versuch keine endgültige Lösung erfuhr.

In weiteren Mitteilungen werde ich zusammen mit Herrn cand. med. E. Petzsch über weitere Versuche berichten, die die Frage nach der Abhängigkeit des anorganischen Stoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten besser beantworten werden.

Aus den bisher veröffentlichten Versuchen lassen sich demnach zunächst nur folgende Schlüsse ziehen:

1. Selbst bei Verabreichung einer sehr kalkreichen Nahrung, wie es der Hundekuchen ist, ist es bei Hunden nicht immer möglich, bei gleichzeitigem Stickstoffgleichgewicht oder -ansatz auch Gleichgewicht oder Ansatz des Kalks zu erzielen.

2. Wenn das Verhältnis des Kalks zum Stickstoff im Hundekuchen 1:4,5 beträgt, wie es bei den ersten beiden Versuchen der Fall ist, so zeigt sich mit Deutlichkeit die Tatsache, daß der Kalkstoffwechsel teilweise vom Stickstoff beeinflußt wird, zum größeren Teile aber durch einen anderen Faktor eine Schädigung in dem Sinne erleidet, daß nicht unbeträchtliche Kalkmengen dem Organismus entzogen werden. Diese Schädigung wird — um nichts vorwegzunehmen — durch die Menge und Art der Nahrung herbeigeführt.

3. Erst wenn das Verhältnis Kalk zu Stickstoff im Hundekuchen 1:3 beträgt, ist diese „Nahrungsschädigung" nicht mehr zu beobachten. (S. Versuch Nr. 3.)

4. Der Magnesia- und Phosphorsäurestoffwechsel zeigt sich in den Versuchen nicht scharf charakterisiert.

Über den Nucleasegehalt verschiedener Organe des Menschen und der Tiere.

Von

A. J. Juschtschenko.

(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie des Kaiserlichen Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(*Eingegangen am 12. Februar 1911.*)

Den Nucleasegehalt bestimmen die meisten Forscher [Steudel[1]), Schmiedeberg[2])[3]), Schittenhelm[4])[5]), Schmidt[6]), Jones[7])[9]), Austrian[8]), Battelli und Stern[10]), Frank[11]),

[1]) Steudel, Nucleine, Nucleinsäure und ihre Spaltprodukte. Biochem. Centralbl. 1907.

[2]) Schmiedeberg, Über die Nucleinsäure aus Lachsmilch. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 43.

[3]) Schmiedeberg, Beiträge zur Kenntnis der tierischen Nucleinsäure. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51.

[4]) A. Schittenhelm, Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Zeitschr. f. phys. Chem. 1905.

[5]) A. Schittenhelm, Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. phys. Chem. 1908.

[6]) Schittenhelm und Schmidt, Ablauf des Nucleinstoffwechsels in menschlischen Organen. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1907.

[7]) Jones, Über das Vorkommen der Guanate in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz der Schweine. Zeitschr. f. phys. Chem. 1905.

[8]) Jones und Austrian, Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. phys. Chem. 1906.

[9]) Jones, Über die Beziehung der aus wässerigem Organextrakt gewonnenen Nucleinfermente zu den physiologischen Vorgängen im lebenden Organismus. Zeitschr. f. phys. Chem. 1910.

[10]) Battelli und Stern, Untersuchungen über die Uricase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 1909.

[11]) Frank und Schittenhelm, Über die Umsetzung verfütterter Nucleinsäure beim normalen Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. 1909.

Wiener[1]), Iwanoff[2]), Sachs[3]), Brugsch[4])], nach der bei der enzymatischen Nucleinsäurespaltung erhaltenen Purinbasenmenge. Araki[5]), Kikkoji[6]) und einige andere berechnen den Gehalt dieses Ferments aus der bei dieser Spaltung erhaltenen Phosphorsäuremenge.

Auf Frau Dr. N. Siebers Vorschlag hin bediente ich mich zur Bestimmung des Nucleasegehalts und der Verteilung desselben in verschiedenen Organen und Geweben des Menschen und der Tiere der zweiten Methode.

Um einem Vorwurf, daß es sich bei dieser Spaltung nicht nur um Phosphorsäure aus der Nucleinsäure handeln könnte, vorzubeugen, bestimmten wir die in der Nucleaselösung vorhandene, aus Nucleoalbuminen und Phosphatiden entstandene Phosphorsäure und fanden, wie es aus unseren Versuchen hervorgeht, die Menge derselben so gering, daß man sie übergehen kann.

Beim Vergleich der beiden Methoden war gegen beide gleich viel auszusetzen: die Möglichkeit einer weiteren Oxydation der Purinbasen einerseits, die Verbindung der Phosphorsäure mit organischen Körpern anderseits. Von den Vorteilen der Phosphorsäuremethode war zu erwähnen, daß dieselbe das Endprodukt der Nucleinsäurespaltung darstellt, wogegen die Purinbasen sehr leicht einer weiteren Zersetzung unterliegen können. In einer zweiten Mitteilung werden wir über den Nucleasegehalt verschiedener Organe normaler und thyreodektomierter Tiere berichten, wobei wir uns ebenfalls der zweiten Methode bedienten, d. h. die Nucleasemenge aus der bei der Spaltung erhaltenen Phosphorsäuremenge berechneten. Auf den

---

[1]) Schittenhelm und Wiener, Über das Vorkommen und die Bedeutung von Allantoin im menschlichen Urin. Zeitschr. f. phys. Chem. 1909.

[2]) Iwanoff, Über die Fermentzersetzung der Thymonucleinsäure durch Schimmelpilze. Zeitschr. f. phys. Chem. 39, 1903.

[3]) Sachs, Über die Nuclease. Zeitschr. f. phys. Chem. 46, 1905.

[4]) Brugsch und Schittenhelm, Der Nucleinstoffwechsel und seine Störungen. Jena 1910.

[5]) Araki, Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. Zeitschr. f. phys. Chem. 38, 1903.

[6]) Kikkoji, Über das Vorkommen von einem Nucleinsäurespaltungsferment in Cortinellus edotes. Zeitschr. f. phys. Chem. 1907.

Nucleasegehalt wurden untersucht: Blut und verschiedene Organe des Menschen, des Hundes, des Pferdes, der Kuh, des Kaninchens, des Huhns und des Sandarts.

Das Blut wurde in einer Verdünnung mit Wasser (1:10) angewandt. Die frischen Organe wurden fein zerkleinert und im Laufe von 48 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85%ig) extrahiert. Die Organe des Menschen stammten von einem Erhängten, bei dem während der gerichtlich-chemischen Sektion in den Organen nichts Pathologisches gefunden wurde. Diese im luftleeren Raum bei 38° getrockneten Organe wurden fein verrieben und im Laufe von ebenfalls 48 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert.

10 bis 20 ccm dieser Extrakte, entsprechend 1 bis 2 g Organe, wurden in einem sterilen Kolben mit der gleichen Menge einer 1%igen Nucleinnatriumlösung versetzt. In wenigen Fällen mußten die Versuche mit 2 bis 5 ccm Extraktlösung angestellt werden, wobei die Berechnungen aber immer 1 g Organ (resp. 10 ccm Extrakt) entsprechen. Die Kontrollversuche wurden mit derselben Menge Extrakt versetzt, gekocht und nach Erkalten die Nucleinnatriumlösung hinzugetan.

Die Versuchs- und Kontrollkolben, versehen mit einigen Tropfen Chloroform und Toluol, wurden auf 40 bis 42 Stunden in einen Thermostat von 37 bis 38° gestellt und öfters geschüttelt. Es erwies sich, daß eine solche Zeitdauer bei Versuchen mit Organen erwachsener Hunde, Pferde, Kühe und Fische erforderlich ist, wogegen bei Versuchen mit Organen des Menschen, der Hühner und junger Hündchen 24 bis 25 Stunden vollständig genügen. Gleich nach der Herausnahme aus dem Thermostat wurde der Inhalt der Kolben in Schalen ausgegossen, in einem Trockenschrank bei 55 bis 65° gut getrocknet und der anorganische Phosphor nach Stutzer-Neumann bestimmt.

In der folgenden Tabelle ist der Gehalt des Gesamtphosphors in 10 ccm meiner Extrakte in Milligramm ausgedrückt:

Organextrakt	Leber	Schilddrüse	Milz	Gehirn	Niere	Blut	Hoden des Hundes	Sandartleber	Sandartkiemen
P_2O_5 . . . . . mg	6,54	2,54	3,8	4,17	2,09	0,14	1,91	7,51	3,55

10 ccm der Nucleinnatriumlösung resp. 0,1 ccm Nucleinnatrium gaben im Durchschnitt 17,4 bis 18,5 mg P_2O_5.

Um uns zu überzeugen, ob es sich nicht um anorganischen Phosphor aus dem nucleinsauren Natrium resp. aus den Nuclease enthaltenden Organen handeln könne, machten wir folgende Versuche:

In 20 ccm Nucleinnatriumlösung konnten nach 48 Stunden langem Stehen im Thermostat bei 38° nach Stutzer-Neumann nur 0,55 bis 0,6 mg P_2O_5 nachgewiesen werden.

Dieselben Versuche mit 0,3 g Nucleoproteid gaben absolut keinen anorganischen Phosphor.

Es erwies sich als zweckmäßiger, die Extrakte mit physiologischer Kochsalzlösung und nicht mit Wasser herzustellen. Einen kurzen Versuch wollen wir hier darstellen:

	P_2O_5-Gehalt in		Zeitdauer
	Leber mg	Schilddrüse mg	
10 ccm Wasserextrakt + 10 ccm 1%iges Nucleinnatrium	15,08	11,91	42 Std. bei 38°
10 ccm physiologisches Kochsalzextrakt + 10 ccm 1%ig. Nucleinnatrium	16,04	13,44	do.

Während wir uns, wie gesagt, für die Phosphorsäurebestimmung entschlossen haben, unternahmen wir zugleich in einigen Versuchen die Purinbasenbestimmung und wollen hier dieselbe kurz schildern:

Aus Leber und Niere des am 25. September durch Blutentnahme getöteten normalen Kaninchens wurden mit physiolog. Kochsalzlösung im Laufe von 24 Std. Extrakte hergestellt (1:10). Zu je 60 ccm dieser Extrakte resp. 6 g Organe wurden am 27. September 0,6 g nucleinsaures Natrium hinzugetan und die Kolben auf 24 Stunden in einen Thermostat gestellt. Außerdem wurden Kontrollkolben angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt filtriert und in 10 ccm desselben resp. 1 g Organ und 0,1 g Nucleinnatrium der anorganische Phosphor nach Stutzer bestimmt: Leber 13,06 mg P_2O_5, Niere 11,54 mg P_2O_5.

Die Kontrollkolben enthielten in der Leber 2,15 mg P_2O_5, in der Niere 2,16 mg P_2O_5.

Durch die in 5 g Leber enthaltene Nucleasemenge sind also aus 0,5 g Nucleinnatrium 54,5 mg P_2O_5 abgespalten und durch dieselbe Menge Niere 47,8 mg P_2O_5 abgespalten worden.

Zu dem übrigen, durch Essigsäure von Eiweißstoffen befreiten Filtrat wurde eine wässerige Salzsäurelösung hinzugetan, wobei in den Versuchsfiltraten nur eine sehr geringe Trübung entstand, in den Kontrollfiltraten dagegen aber ein reichlicher flockiger Niederschlag von Nucleinsäure sich schnell absetzte. In beiden Flüssigkeiten wurden die Niederschläge abfiltriert und im Filtrat die Purinbasenbestimmung nach Krüger und Schmidt ausgeführt.

Das Versuchsfiltrat gab folgenden Gehalt an Purinbasenstickstoff: Leber 32,9 mg N, Niere 27,8 mg N.

Das Kontrollfiltrat: Leber 2,5 mg N, Niere 4 mg N.

In der folgenden Tabelle ist die Berechnung auf 10 g Organ und 1 g Nucleinnatrium gemacht:

	P_2O_5-Gehalt			N-Gehalt der Purine		
	Versuch mg	Kontrolle mg	Enzymat. Differenz mg	Versuch mg	Kontrolle mg	Enzymat. Differenz mg
Leber	130,6	21,50	109,1	65,8	5,0	60,8
Niere	115,4	19,8	95,6	55,6	8,0	47,6

Ein zweites Mal wurde die Purinbasenbestimmung in derselben Weise ausgeführt, der Kupferniederschlag aber mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Dieser vom Silber durch Salzsäure befreite Niederschlag gab die den Purinbasen charakteristischen Farbenreaktionen.

Den Einfluß von Alkalien auf die Nucleasewirkung haben wir in folgender Tabelle dargestellt:

	P_2O_5-Gehalt mg	P_2O_5-Gehalt bei Zusatz von 0,2 g Natriumcarbonat mg
10 ccm Leberextrakt + 0,1 g Nucleinnatrium	15,91	8,87
10 ccm Schilddrüsenextrakt + 0,1 g Nucleinnatrium . . .	13,78	2,79

Bei Organextraktion geht im Laufe von 48 Stunden die Hauptmenge der Nuclease in die Lösung über, und nur ein geringer Teil derselben wird im Laufe dieser Zeit nicht extrahiert. In der folgenden Tabelle ist der Nucleasegehalt in den extrahierten und ausgepreßten Organen dargestellt:

	P_2O_5-Gehalt mg
1,2 g Leberrest + 0,1 g Nucleinnatrium	7,6
1,2 g Schilddrüsenrest + 0,1 g Nucleinnatrium	8,24

$^2/_3$ der Nucleasemenge gehen also in das Extrakt über, und $^1/_3$ bleibt in den Organen.

Über den Einfluß der Zeitdauer des Siedens, längeren Stehens im Thermostaten und der Erhaltung der Nucleaseaktivität in den Organen nach dem Tode haben wir folgende Beobachtungen gemacht:

Im Oktober 1909 wurde ein Teil vollständig frischer Pferdeorgane fein verrieben und aus denselben ein Extrakt hergestellt. Der zweite Teil, mit Chloroform und Toluol versehen, wurde in einem sterilen Glase auf 5 Tage an einen kühlen Ort gestellt. Die Schilddrüse dieses Pferdes war nicht normal und zeigte leicht wahrnehmbare, kolloidartig entartete Distrikte.

10 ccm des im Laufe von 24 Stunden hergestellten Extrakts aus dem ersten Teil, versehen mit 0,1 g Nucleinnatrium, wurden auf 42 Stunden in einen Thermostat bei 38° gestellt und 10 ccm desselben Extrakts mit 0,1 g Nucleinnatrium zur Kontrolle gleich in eine Schale ausgegossen und in einem Trockenschrank bei 60° gehalten.

Das aus dem zweiten Teil der Organe nach 5 Tage langem Stehen an einem kalten Ort hergestellte Extrakt wurde in der bekannten Weise, d. h. mit dem Nucleinnatrium versehen, auf 42 Stunden in den Thermostat gestellt; gleichfalls wurden Kontrollkolben angestellt.

Die folgende Tabelle (S. 383) gibt über diese Versuche einen Überblick.

Das Aufbewahren der Organe in der Kälte hemmt die Nucleaseaktivität nur sehr wenig, und deshalb bietet dieses in

den Organen des Menschen und der Tiere sehr verbreitete Ferment ganz besonderes Interesse. In der stromaartig degenerierten Schilddrüse war der Nucleasegehalt bedeutend geringer und entsprach ungefähr der Hälfte des normalen Gehalts.

		P_2O_5-Gehalt in						
		Milz mg	Leber mg	Gehirn mg	Pankreas mg	Herz mg	Schilddrüse mg	Stroma mg
Das aus frischen Organen gleich hergestellte Extrakt	vor dem Thermostat	5,68	5,68	5,06	6,96	3,17	3,68	2,16
	nach dem Thermostat	12,47	16,23	8,17	15,50	11,92	11,41	6,09
Das nach 5 Tage langem Stehen hergestellte Extrakt	ungekocht	12,80	16,01	8,29	15,98	11,38	11,80	6,75
	gekocht (Kontrolle)	3,49	3,37	4,67	6,75	4,44	3,68	2,08

In der S. 384 folgenden Tabelle ist der Nucleasegehalt in verschiedenen Organen des Menschen und der Tiere, berechnet auf 10 ccm Extrakt resp. 1 g Organ und 10 ccm einer 1%igen Nucleinnatriumlösung resp. 0,1 g Nucleinnatrium dargestellt.

In der ersten Reihe ist der Phosphorgehalt der Versuche in Milligramm, in der zweiten derselbe der Kontrollproben und in der dritten die durch die in 1,0 g der Organe enthaltene Nuclease hervorgerufene Differenz dargestellt.

Aus dieser Tabelle geht der Nucleasegehalt des Blutes, des Serums und aller Organe deutlich hervor, wobei der Gehalt derselben in folgender absteigender Reihe sich anordnen läßt: Leber, Niere, Milz, Pankreas und Schilddrüse enthalten bedeutende Mengen, Gehirn, Nebennieren, Lunge und lymphatische Drüsen geringere Mengen, Herz, Blut, Muskel und Serum sind nucleasearm. Das Blut der Hunde, Kaninchen und Rinder ist nucleasereicher als das der Menschen. Die Leber der Menschen, Pferde, Rinder, Kaninchen und des Sanders ist nucleasereicher als die der Hunde. In den meisten Organen junger Hündchen ist der Nucleasegehalt geringer als in denselben bei erwachsenen Tieren. Die Organe des Menschen sind im allgemeinen nucleasereich. Von Wichtigkeit ist die Erhaltbarkeit der Nucleaseaktivität im Laufe längerer Zeit nach dem Tode und deshalb

eine in dieser Richtung erwünschte Untersuchung an Leichen möglich.

	P_2O_5-Gehalt													
	Blut	Serum	Leber	Niere	Milz	Gehirn	Herz	Lunge	Pankreas	Schilddrüse	Lymphdrüsen	Geschlechtsdrüsen	Nebennieren	Muskel
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
Mensch	1,42		16,48	16,48		13,01		12,8						5.28
	0,82		3,16	3.55		6,59		3,0						2.88
	0,62		13,32	12,93		6,42		9,8						2.40
										0,5 g			0,5 g	
Gut ernährte Hündin	3,08		12,68	12,75	11,0		7,53	9,38		6,09			5,19	
	1,04		4,31	3,42	2,54		4,33	3,29		1,42			1,66	
	2,04		8,37	9,33	8,46		3,20	6,09		4,67			3,53	
		2 ccm								0,5 g				
Schlecht ernährter Hund	3,04	3,29	11,81	15,85	13,69	11,60	8,49	7,74	14,71	7,0	9,13	9,64		
	1,65	1,14	3,17	6,34	3,04	2,28	4,43	2,22	6,50	1,8	3,92	4,31		
	1,39	2,15	8,64	9,51	10,65	9,32	4,06	5,52	8,21	5,2	5,21	5,33		
												0,5 g		
Junger Hund 3 Mon. 10 T.	2,15		11,59	12,56	12,49	9,65	5,37					3,36		
	0,95		3,46	3,63	2,96	2,01	3,09					1,07		
	1,20		8,13	8,93	8,53	7,64	2,28					2,29		
Junger Hund 2 Mon. 3 T.	2,12		11,08	12,74	11,02	9,98	4,57			11,37		8,17		
	1,07		2,65	4,37	2,82	1,88	3,09			4,89		3,46		
	1,05		8,43	8,37	8,20	8,10	1,48			6,48		4,71		
		2 ccm												
Pferd		2,98	16,19		12,89	9,29	9,28		14,98	11,89				
		1,27	5,27		3,49	3,67	4,44		6,95	3,68				
		1,71	10,92		9,40	5,62	4,89		8,03	8,21				
Kuh	3,08		13,75	14,33	15,33	9,87				12,55	8,62		10,91	
	1,14		3,30	3,91	4,69	2,16				3,20	4,45		3,04	
	1,94		10,45	10,42	10,64	7,71				9,35	4,17		7,87	
Kaninchen	2,06		13,06	11,94	13,92	8,01								5.61
	0,81		2,54	2,54	4,94	2,41								4.31
	1,25		10,52	9,40	8,98	5,60								1,30
Huhn	1,97		13,82	8,98		7,12	5,78							5.17
	0,78		3,55	2,92		4,09	3,06							3.80
	1,19		10,27	6,06		3,03	2,72							1.37
								Kiemen				Sperma		
Sandart			12,68				6,34	9,0				6,04		
			3,86				2,85	3,7				4,5		
			8,52				3,49	6,3				1,54		

Das Schardinger-Enzym in Milch von euterkranken Kühen.

Von

Richard Reinhardt und Ernst Seibold.

(Aus dem Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztl. Hochschule zu Stuttgart.)

(Eingegangen am 20. Februar 1911.)

Milchproben von euterkranken Kühen sind bis jetzt offenbar nur verhältnismäßig wenig mittels des Schardingerschen Reagenses geprüft worden. Koning[1]) hat die Milch von etwa 25 euterkranken Kühen untersucht und ist auf Grund dieser Untersuchungen zu dem Ergebnis gekommen, daß, während die Milch nicht frischmilchender gesunder Kühe normalerweise innerhalb 4 bis 12 Minuten eine Entfärbung des zugesetzten Schardinger-Reagenses herbeiführt, die Milch aus kranken Eutern außerordentlich schnell, manchmal schon innerhalb 1 Minute entfärbt, also eine Zunahme des Enzymgehalts durch die Entzündungsvorgänge erfahren hat. Dabei hat es sich häufig um Kühe gehandelt, bei denen klinisch an dem Euter nichts Abnormes festzustellen, und deren Milch dem Ansehen nach nicht verändert war. Koning meint, daß der erhöhte Enzymgehalt nicht auf pathogene Mastitisbakterien zurückzuführen sei, sondern mit einem veränderten Stoffwechsel der sezernierenden Zellen im Zusammenhang stehe; mit Hilfe der Enzymmethode, d. h. durch Feststellung des Gehalts an Schardinger-Enzym neben der des Katalase- und Diastasegehalts können euterkranke Kühe herausgefunden, ja sogar Beimengungen von Sekret aus entzündeten Eutern in der Handelsmilch nachgewiesen werden.

[1]) Biolog. u. biochemische Studien üb. Milch. 2. Heft. Leipzig 1908.

Rievel geht in seinem Handbuch der Milchkunde, 2. Aufl., noch weiter, indem er auf S. 312 sagt: „Reduziert die Milch die Formalin-Methylenblaulösung sehr schnell, so liegt der Verdacht einer Euterentzündung vor, und zwar einer Streptokokkenmastitis."

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Koning ist Sassenhagen[1]) gekommen, der die Milch von 21 mastitiskranken Kühen hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber dem Schardingerschen Reagens untersucht und gefunden hat, daß diese meistens eine Beschleunigung der Reaktion herbeiführt; nur mit einigen Proben erhielt er einen negativen bzw. verzögerten Verlauf der F. M.-Reaktion. Übrigens haben diese Untersuchungen im Wasserbad von 70° stattgefunden und nur bei 5 Kühen auch bei 40°; im letzteren Falle wurden Reaktionszeiten von 4, 3½, 14, 7 und 12 Minuten erzielt.

Zu einem entgegengesetzten Ergebnis kam Schern[2]), der allerdings die Milch von nur einer euterkranken Kuh untersucht hat. In diesem einen Falle hat das Sekret weder bei 45° noch bei 65° entfärbt, und zwar nach der Ansicht Scherns deshalb nicht, weil dem auffallend veränderten Sekret sehr viel bei der Entzündung abgeschiedene Flüssigkeit (Serum) beigemischt war. Zu dieser Annahme gelangte Schern durch die Beobachtung, daß, wenn er normaler Milch verhältnismäßig viel Rinderserum zusetzte, eine der Menge des zugesetzten Serums entsprechende Verzögerung der Reaktion eintrat. Stellte er die Reaktion mit dem flockenreichen, lumigen Bodensatz der Milch an, so entfärbte dieser das Reagens innerhalb 10 Minuten.

Bei der Verschiedenheit der Untersuchungsergebnisse und bei der hohen Bedeutung, die insbesondere von Koning und von Rievel der Feststellung des Gehalts an Schardinger-Enzym für die Eruierung euterkranker Kühe beigemessen wird, hielten wir es für angezeigt, die Sache weiter zu verfolgen. Wir haben deshalb die Milch von 10 euterkranken Kühen auf ihren Reduktasegehalt geprüft. Es handelte sich in allen Fällen um „altmilchende" Kühe; die Untersuchung dieser und die Entnahme der Milch erfolgte am 1. oder 2. Tage nach dem Auftreten offensichtlicher Krankheitserscheinungen. Es wurde in der Regel die dem kranken Euterviertel entnommene Milch und die Mischmilch aus den gesunden Vierteln bzw. aus sämtlichen 4 Vierteln, in einzelnen Fällen auch die Milch jedes einzelnen Euterviertels je für sich untersucht. Wo es möglich war, wurde die Milch nach mehreren Tagen bzw. nach Ablauf der Entzündung einer nochmaligen Untersuchung unterzogen.

[1]) Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- u. Mastitismilch. Stuttgart 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 18, 274.

Nur beim 10. Fall konnte die Milch auch schon vor Auftreten der Euterentzündung und auch während und nach der Entzündung über eine längere Periode hin untersucht werden. Die Reaktionen wurden stets bei 45° angestellt.

Über die Einzelheiten geben nachstehende kurze Protokollauszüge[1]) Auskunft.

1. Fall.

Kuh O. T. leidet an einer akuten interstitiellen Entzündung des l. h. Euterviertels. Die Milch ist dem Aussehen nach nicht verändert, zeigt amphotere Reaktion; bei der Alkoholprobe fallen feine Gerinnsel aus; Kochprobe ist negativ. Die übrigen 3 Viertel sind gesund; dagegen gerinnt die Milch des r. v. Viertels bei der Alkoholprobe. Die Rahmmenge ist bei der Milch aus jedem der 4 Viertel annähernd gleich.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes: v. r. Viertel entfärbt bei 45° in 8 Min., v. l. Viertel, h. r. Viertel und h. l. Viertel je in 5 Min.

Ergebnis: Die Milch des kranken Viertels entfärbt nicht früher als die der andern Viertel und zeigt dem Schardinger-Reagens gegenüber keine Abweichung von der Milch eines gesunden Euters.

2. Fall.

Kuh H. C. leidet an einer akuten katarrhalischen Entzündung des l. v. Euterviertels. Die Milch aus diesem Viertel ist von weißer Farbe und zeigt gleich nach dem Melken flockige Gerinnsel.

Die Entfärbung des F. M. tritt bei der Milch des kranken Viertels in 3 Min., der Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln in $3^1/_2$ Min. und der Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln in 4 Min. bei 45° ein.

Bei einer 5 Tage darauf vorgenommenen zweiten Untersuchung entfärben die Milchen in 3, 4 und $5^1/_2$ Min. Die Entzündungserscheinungen am Euter bestehen noch.

Ergebnis: Das Sekret aus dem kranken Viertel entfärbt etwas rascher als die Mischmilch sämtlicher 4 bzw. der 3 gesunden Viertel und entfärbt namentlich auch in kürzerer Frist, als dies normale Milch zu tun pflegt. Dagegen hält sich die Reaktionszeit der Mischmilch aus allen 4 Vierteln in normalen Grenzen.

3. Fall.

Kuh B. F. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des h. r. Euterviertels. Das Sekret aus diesem Viertel ist gelb und enthält zahlreiche großflockige, gelbe Gerinnsel; nach längerem Stehen scheidet sich über dem sehr voluminösen Bodensatz wenig gelbe, trübe Flüssigkeit ab. Die Milch der übrigen 3 Viertel ist dem Aussehen nach normal.

---

[1]) Die ausführlicheren Protokollauszüge sind in den Monatsheften für prakt. Tierheilk. 23 veröffentlicht, wo wir uns auch über die praktische Bedeutung der Schardinger-Probe für die Erkennung euterkranker Kühe näher ausgelassen haben.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

v. l. Viertel entfärbt in $7^1/_2$ Min., v. r. Viertel in $9^1/_2$, h. l. Viertel und h. r. Viertel je in 6 Min.

Am folgenden Tage entfärbt das Sekret des kranken Viertels innerhalb 3 Min. Das Sekret hatte dieselbe Beschaffenheit und dasselbe Aussehen wie tags zuvor.

20 Tage nach der ersten Untersuchung erscheint das Euter gesund und die Milch von normaler Beschaffenheit. Entfärbung der Mischmilch tritt in 20 Min. ein.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat das veränderte Sekret innerhalb der für gesunde Milch als normal zu bezeichnenden Zeit entfärbt; am folgenden Tage war die Reaktionszeit kürzer als bei gesunder Milch. Nach dem Ausfall der letzten Untersuchung ist zu schließen, daß die Reduktase in dem veränderten Sekret gegen die Höhe der Entzündung zu reichlicher vorhanden war als vor und nach der Erkrankung des Euters.

4. Fall.

Kuh St. Ö. ist an akuter parenchymatöser Entzündung des l. v. Euterviertels erkrankt. Das Sekret aus diesem Viertel ist gelb, wässerig, mit wenigen gelben Flocken untermischt; beim Stehen setzt sich wenig gelbschleimiger Bodensatz ab, darüber ziemlich viel gelbe, seröse Flüssigkeit. Milch der übrigen 3 Viertel ist von normaler Beschaffenheit.

Das kranke Sekret entfärbt F. M. innerhalb 1 Stunde nicht; nur der Bodensatz zeigt sich innerhalb 12 Min. entfärbt. Die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln wird ebenfalls nicht entfärbt, sie zeigt nach 1 Stunde nur eine geringe Aufhellung.

Nach 20 Tagen zeigt sich das Euter vollständig gesund und die Milch von normaler Beschaffenheit. Auch jetzt zeigt die Mischmilch aus allen 4 Vierteln nach 1 Stunde nur eine ganz minimale Aufhellung.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat weder das kranke Sekret noch die Mischmilch der 3 gesunden Viertel entfärbt; auch bei der zweiten Untersuchung ist keine Entfärbung der Mischmilch eingetreten. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Milch dieser Kuh zur Zeit der Untersuchung überhaupt nur wenig Enzym enthalten hat. Vorstehender Fall dürfte den Ausnahmefällen einzureihen sein, bei denen auch die gesunde Milch die Schardinger-Reaktion nicht gibt und die von uns in einer früheren Abhandlung in dieser Zeitschrift mehrfach beschrieben sind.

5. Fall.

Kuh Sch. Ö. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des r. v. Euterviertels. Das Sekret dieses Viertels ist von gelber Farbe, wässeriger Beschaffenheit und mit gelben, flockigen Gerinnseln untermischt; die Milch aus den 3 anderen Vierteln ist normal.

Weder das Sekret des v. r., noch des h. r., noch die Mischmilch der beiden h. Viertel entfärben F. M. innerhalb 1 Stunde.

Ergebnis: Dieser Fall dürfte wie der 4. Fall zu beurteilen sein.

6. Fall.

Kuh Schl. G. ist mit einer chronischen parenchymatösen Entzündung des r. h. Euterviertels behaftet; im r. v. Viertel lassen sich einige haselnußgroße derbe Knoten feststellen. Das Sekret des r. Hinterviertels ist gelb, wässerig und enthält wenige gelbe Flocken; das Sekret des r. Vorderviertels ist gelbweiß mit feinen weißen Gerinnseln. Das Sekret aus den beiden r. Eutervierteln reagiert alkalisch, die Milch der beiden l. Viertel, die normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, amphoter.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

Das Sekret des	h. r. V.	entfärbt	innerhalb	1	Stunde nicht.
„ „ „	h. l. V.	„	nach	6	Min.
„ „ „	v. r. V.	„	„	10	„
„ „ „	v. l. V.	„	„	$6^1/_2$	„

Mischmilch zu gleichen Teilen aus allen 4 Vierteln entfärbt nach 6 Min.

Ergebnis: Das veränderte Sekret des r. v. Viertels und die Milch der beiden linken Viertel entfärben innerhalb der Zeit gesunder Milch. Das Sekret des r. Hinterviertels, das wässerig war und fast ausschließlich aus Serum bestand, entfärbte innerhalb 1 Stunde nicht. Bei Mischmilch verschwand der Unterschied in der Reaktion der einzelnen Milchproben so sehr, daß Entfärbung innerhalb der normalen Zeit eintrat.

7. Fall.

Kuh K. G. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des r. v. Euterviertels. Das r. Hinterviertel ist verödet. Das Sekret des r. v. Viertels ist gelb, wässerig, mit feinen, gelben Gerinnseln. Der Bodensatz beträgt etwa ein Viertel des ganzen Sekrets.

Das Sekret des kranken Viertels entfärbt F. M. in $10^1/_2$ Min., die zusammengemolkene Milch der beiden gesunden Viertel in $6^1/_2$ Min. Nach 7 Tagen sind die Entzündungserscheinungen nur wenig zurückgegangen. Das Sekret des r. v. Viertels entfärbt in 10 Min., das der gesunden Viertel in 5 Min.

Ergebnis: Obwohl das Sekret des kranken r. v. Viertels sehr stark vermindert ist, tritt doch Entfärbung innerhalb der Norm ein. Das Sekret aus den gesunden Vierteln entfärbt rascher als das aus dem kranken.

8. Fall.

Kuh B. II F. leidet an akuter, parenchymatöser Entzündung des v. l. Euterviertels. Das Sekret ist gelb, wässerig, mit großen, gelben Flocken vermischt; der Bodensatz beträgt ein Drittel des Sekrets; die Flüssigkeit darüber ist gelb und trüb. Die Milch aus den 3 anderen Eutervierteln erscheint normal.

Bei Zusatz von F. M. entfärbt das kranke Sekret erst in 1 Stunde 43 Min., während das Gerinnsel (Bodensatz) bereits nach 10 Min. seine ursprüngliche gelbe Farbe angenommen hat; die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln entfärbt nach 7 Min.

Nach 4 Tagen sind die Entzündungserscheinungen wesentlich zurückgegangen; das kranke Sekret ist rötlichgrau und enthält feine, graugelbe Gerinnsel; der Bodensatz beträgt etwa ein Viertel des Sekrets; die Flüssigkeit darüber ist grauweiß und besitzt eine reichliche Rahmschicht. Die Reaktionszeit des kranken Sekrets auf F. M. beträgt $3^1/_2$ Min., die der gesunden Mischmilch 8 Min.

Nach weiteren 5 Tagen sind die Entzündungserscheinungen am Euter nahezu verschwunden, das kranke Sekret ist von gelber Farbe, colostrumähnlich; nach dem Zentrifugieren zeigt sich ein gelber, schleimiger Bodensatz, der etwa ein Viertel des Sekrets ausmacht; die darüber stehende Flüssigkeit ist graugelb und besitzt eine Rahmschicht. Das kranke Sekret entfärbt F. M. in $3^1/_2$ Min., die gesunde Mischmilch in 7 Min., die Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln in 5 Min.

5 Tage nach der letzten Untersuchung sind die Entzündungserscheinungen vollständig zurückgegangen. Das Sekret des kranken Viertels ist von milchiger Beschaffenheit und von gelber Farbe; beim Zentrifugieren erhält man einen aus Zellen bestehenden Bodensatz, der etwa $^1/_{10}$ des Sekrets ausmacht. Die Milch der übrigen Viertel ist normal und weiß. Letztere entfärbt in 7 Min., das Sekret des kranken Viertels in 4 Min.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat das stark veränderte Sekret des kranken Viertels erst in 1 Std. 43 Min. entfärbt. Nach Rückgang der Entzündungserscheinungen entfärbt das kranke Sekret früher als gesunde Milch. Die Milch aus den gesunden Vierteln hat stets innerhalb der normalen Zeit entfärbt.

9. Fall.

Kuh W. G. ist an einer akuten, parenchymatösen Entzündung des v. l. Euterviertels erkrankt und ist außerdem noch mit Euterpocken behaftet. Das Sekret des erkrankten Viertels ist von gelber Farbe, enthält zahlreiche Eiterklümpchen und ist höchst übelriechend; der Bodensatz verhält sich zu der darüberstehenden, gelben, wässerigen Flüssigkeit wie 2:1. Die Milch aus den übrigen 3 Vierteln erscheint normal.

Das zugesetzte F. M. wird von dem Sekret des v. r., des h. r. und des h. l. Viertels und ebenso von der Mischmilch aus diesen 3 Vierteln nach 1 Stunde nur aufgehellt, von dem des v. l. Viertels nach 7 Minuten und von der Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln nach 14 Minuten entfärbt; bei der Entnahme und Untersuchung der Milch am folgenden Tag entfärbt das Sekret des kranken Viertels in 10 Minuten und die Mischmilch aus allen 4 Vierteln in 18 Minuten, während die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln nicht entfärbt.

Am nächstfolgenden Tage war das Verhältnis ein ähnliches; die kranke Milch entfärbte nach 7 Minuten, die Mischmilch aus allen 4 Vierteln nach 10 Minuten, und die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln brachte während 1 Stunde nur eine geringe Aufhellung zustande.

Am 13. Tage nach der ersten Untersuchung ist der Befund am Euter noch derselbe; aus dem kranken Euterviertel lassen sich jedoch

nur einige Kubikzentimeter dicken, gelben, stinkenden Sekrets ausmelken. Die Mischmilch aus den 3 gesunden Euterviertein entfärbt nach 31 Minuten, 9,5 ccm dieser Mischmilch + 0,5 ccm krankes Sekret entfärben nach 17 Minuten.

Ergebnis. Das Sekret aus dem kranken Viertel hat bei allen Untersuchungen das Schardinger-Enzym reichlicher enthalten als die Milch aus den gesunden Vierteln; es war jedoch in dem kranken Sekret nur in solcher Menge vorhanden, daß die Reduktionszeit von der gesunder Milch nicht abgewichen ist. Die Milch aus den gesunden Vierteln hat nicht entfärbt. Die dritte Untersuchung zeigt indes, daß solche Milch durch die Beimengung von krankem Sekret derart beeinflußt werden kann, daß die Mischmilch eine normale Reaktionszeit liefert.

10. Fall.

Kuh S. J. ist mit Lungentuberkulose behaftet; das Euter ist gesund; der Milchertrag ist gering (2 l pro die); die Milch selbst ist von normaler Beschaffenheit und wird während 14 Tagen durch tägliche Untersuchungen auf ihr Verhalten gegenüber dem Schardinger-Reagens geprüft. Die Reduktionszeit schwankt zwischen 7 und 24 Minuten, der Durchschnitt beträgt zwischen 16 und 17 Minuten.

Am 14. XI. 1910 zeigt sich eine diffuse Schwellung der beiden hinteren Euterviertel, am 15. XI. des ganzen Euters; am 18. XI. hat sich der Prozeß auf das l. v. Viertel lokalisiert, das eine akute parenchymatöse Entzündung aufweist, die am 13. XII. noch vorhanden ist. Die Mischmilch, die anfangs normale Farbe, feine Gerinnsel und bei der Alkoholprobe starke Gerinnung gezeigt hat, weist vom 16. XI. ab gelbe Farbe auf und ist colostrumähnlich. Am 18. XI. zeigt sie wieder mehr eine weiße Farbe; wird aber bei der Alkoholprobe ausgeflockt, während das Sekret des kranken Viertels gelb, wässerig und mit reichlichen gelbweißen Flocken vermischt ist. Allmählich liefert das v. l. Viertel nur noch einige Kubikzentimeter bald wässerigen, bald mehr dickeren Sekretes.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

Am 14. XI. entfärbt die Mischmilch in 5 Min., am 15. XI. in 6 Min., am 16. XI. in $5^1/_2$ Min., am 17. XI. in 8 Min., am 18. XI. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel in 35 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + 1 ccm krankes Sekret entfärben in 21 Min., am 19. XI. bis 5. XII. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel zwischen 11 und 23 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + 1 ccm krankes Sekret entfärben zwischen 6 und 19 Min., am 13. XII. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel in 40 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + $^1/_2$ ccm krankes Sekret entfärben in 31 Min.

Ergebnis. Zunächst geht aus vorstehenden Untersuchungen hervor, daß die Milch einer altmilchenden Kuh, auch wenn das Euter gesund ist, das Schardinger-Reagens nicht immer innerhalb der als Norm angegebenen Zeit von 4 bis 12 Minuten entfärbt; denn die durchschnittliche Reaktionszeit hat hier zwischen 16 und 17 Minuten betragen. Unmittelbar nach Einsetzen der Euterentzündung war die Reduktionszeit

der Mischmilch kürzer, sie hat 5 Minuten betragen, hat sich aber immer noch in normalen Grenzen gehalten. Später zeigte die Mischmilch aus 3 Vierteln (ohne das Sekret des l. v. Viertels) eine ziemlich lange Reduktionszeit, die stets verkürzt wurde, wenn der Mischmilch aus den 3 Vierteln noch Sekret aus dem stark entzündeten l. v. Viertel zugesetzt wurde; es hat also das stark veränderte Sekret des v. l. Viertels einen größeren Gehalt an Reduktase gehabt als die makroskopisch nicht veränderte Milch der 3 andern Viertel. Im übrigen war der Enzymgehalt der Milch dieses Euters großen Schwankungen unterworfen.

Zusammenfassend haben wir zu bemerken, daß insgesamt 7 Fälle von akuter parenchymatöser Euterentzündung und je 1 Fall von akuter interstitieller, von akuter katarrhalischer und von chronischer parenchymatöser Mastitis zur Untersuchung gelangt sind.

Wir möchten gleich vorausschicken, daß die klinischen Erscheinungen am Euter und die Art der Euterentzündung nicht von entscheidendem Einfluß auf die Art und Weise des Ablaufs der Reaktion sind. Größere Bedeutung in dieser Beziehung kommt der Ausdehnung, dem Grade und dem Stadium der Entzündung und insbesondere der mehr oder weniger starken, meist von der Art, dem Grade und dem Stadium der Entzündung abhängigen Veränderung des Sekretes zu.

So sehen wir, daß bei Euterentzündungen, wo die Milch keine physikalischen Veränderungen aufweist, der Gehalt an Reduktase auch keine Abweichung von der Norm zeigt (siehe 1. Fall), obwohl das Euter selbst auffallend entzündet ist. Solche Verhältnisse trifft man häufig im Anfangsstadium einer Euterentzündung, und bei einer interstitiellen Mastititis eher und länger an als bei den übrigen Arten von Mastitiden.

In anderen Fällen, wo die Milch des erkrankten Viertels zwar noch die normale Farbe, aber beim Melken schon feine Gerinnsel zeigt, kann das Enzym bald vermehrt sein (2. Fall), bald innerhalb der Norm sich halten (6. und 10. Fall). Die Milch hat im 2. Falle in 3 Minuten entfärbt, während die Reaktionszeit beim 6. und 10. Fall 10 und 5 bzw. 6 Minuten (Untersuchung vom 14. und 15. XI.) betragen hat.

Beim 3. Fall (2. Untersuchung) trat Entfärbung schon nach 3 Minuten, also rascher als normal ein, obwohl das Sekret stark verändert war; es war sehr flockenreich, schied aber nur wenig Flüssigkeit ab. Die Entzündung war hier offenbar noch

im Zunehmen begriffen, sie hatte ihren Höhepunkt noch nicht erreicht.

Eine Beschleunigung der Reaktion konnten wir außer bei dem schon erwähnten 2. und 3. Fall auch beim 8. Fall (2. und 3. Untersuchung) feststellen, wo die Entfärbung des Sekretes schon je in $3^1/_2$ Minuten eingetreten ist. In diesem Falle hatte die Euterentzündung ihren Höhepunkt schon überschritten, die Entzündung war bereits im Abklingen und das Sekret näherte sich schon wieder mehr der normalen Beschaffenheit.

Bei auffallend stark verändertem Sekret, insbesondere bei solchem, das gelblich, serös-wässerig, und wo der Bodensatz geringer war als die darüber stehende Flüssigkeit, war bald eine Verzögerung der Reaktion (8. Fall, 1. Untersuchung), bald ein völliges Ausbleiben derselben festzustellen (6. Fall). So hatte beim 8. Fall das stark veränderte Sekret erst nach 1 Stunde und 43 Minuten entfärbt, und im 6. Fall war durch das kranke Sekret überhaupt keine Entfärbung erzielt worden.

Die Fälle 4 und 5 müssen für unsere Beurteilung außer Betracht bleiben, da es sich hier zweifellos um abnorme, den Ausnahmefällen zuzurechnende Milchen, die überhaupt nur wenig Schardinger-Enzym enthalten, gehandelt hat. Auch der 10. Fall ist nicht geeignet, aus ihm einwandfreie Schlüsse abzuleiten, da die Milch der betreffenden Kuh sowohl vor als während der Euterentzündung als nach Ablauf des akuten Entzündungsanfalls große Schwankungen in der Reduktionszeit aufzuweisen gehabt hat. Doch läßt sich so viel sagen, daß das entzündete Viertel ein reduktasereicheres Sekret lieferte als die übrigen Viertel.

Aus obigen Ausführungen geht hervor, daß der Reduktasegehalt der Mastitismilch in erster Linie von dem Grade der Veränderung des Sekrets, weiterhin von dem Grade und dem jeweiligen Stande der Euterentzündung und in letzter Linie von der Art und Ursache der Eutererkrankung abhängig ist. So können wir im Anfangsstadium einer Euterentzündung, wo das Sekret noch normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, oft eine völlig normale Reaktionszeit oder eine beschleunigte Entfärbung beobachten. Derart schnell eintretende Reaktionen, wie sie von Koning und Rievel angegeben werden, nach denen die Entfärbung des kranken Sekrets innerhalb 1 Minute

erfolgen soll, haben wir bei unseren Fällen nie angetroffen. Auch zu der Zeit, wo die Entzündung wieder im Zurückgehen begriffen ist und wo das Aussehen des Sekrets dem normaler Milch sich nähert, treffen wir normale oder beschleunigte Reaktion an. Auf der Höhe der Entzündung, wo das Sekret gelb und stark serös-wässerig ist, ist meistens eine Verzögerung im Ablauf der Reaktion festzustellen oder bleibt die Reaktion ganz aus.

Die wesentlichste Veränderung der Schardinger-Reaktion, nämlich eine Verzögerung oder ein Ausbleiben derselben, tritt also auf der Höhe der Euterentzündung ein. Das ist aber zu einer Zeit, wo man am Euter und an der Milch selbst so auffallende Veränderungen hat, daß man auf jedes weitere Hilfsmittel zur Erkennung der Erkrankung, also auch auf die Schardinger-Reaktion, verzichten kann; zudem ist dieses Hilfsmittel keineswegs ganz zuverlässig; denn es ist ja auch einmal bei normaler Milch aus gesundem Euter eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion anzutreffen. Bei dieser Sachlage müssen wir bestreiten, daß der Schardingerschen Probe in der praktischen Milchkontrolle zum Nachweis von Euterentzündungen eine so hohe Bedeutung zukommt, wie sie ihr von einzelnen Autoren zugeschrieben wird.

Was die Verwertung der Schardinger-Reaktion zur Erkennung von Euterentzündungen im Anfangsstadium, zu einer Zeit, wo die Milch noch normales Aussehen hat und das Euter noch keine klinischen Erscheinungen aufweist, anlangt, so haben wir oben gesehen, daß in solchen Fällen die Milch innerhalb der normalen Zeit entfärbt oder eine kürzere Reaktionszeit aufweist. In letzterem Falle ist aber zu bedenken, daß bei dieser Sachlage stets Mischmilch aus allen 4 Vierteln oder sogar die Sammelmilch einer Mehrzahl von Kühen zur Untersuchung kommt, ein Umstand, durch den die an und für sich nicht sehr bedeutende Abweichung der Reaktionszeit der Milch von der Norm verwischt wird; denn wie die 2. Untersuchung des Falles 2 und die 3. Untersuchung des Falles 7 zeigen, kann sich, auch wenn die Milch des kranken Viertels abnorm rasch entfärbt, die Reaktionszeit der Mischmilch aus allen 4 Vierteln doch in normalen Grenzen halten. Ganz ähnliche Verhältnisse

liegen vor, wenn die Euterentzündung ihren Höhepunkt überschritten hat und im Abnehmen begriffen ist. Es lassen sich also mit Hilfe der Schardingerschen Probe Euterentzündungen in den erwähnten Stadien ebenfalls nicht, und ebensowenig eine Streptokokkenmastitis als solche erkennen.

Im übrigen möchten wir hier noch einmal besonders darauf hinweisen, daß nach unseren Versuchen der Einfluß einer Euterentzündung auf den Reduktasegehalt der Milch ein sehr wechselnder ist und daß Mastitismilch außerordentlich großen Schwankungen bezüglich ihres Verhaltens gegen das Schardinger-Reagens unterworfen ist.

Es wäre noch die Frage zu erörtern, in welcher Weise wohl die bei der Euterentzündung sich abspielenden Vorgänge den Reduktasegehalt beeinflussen. Die Veränderung des Gehalts an Schardinger-Enzym, die wir im Verlaufe einer Mastitis beobachten, läßt sich vielleicht so erklären, daß nicht zu heftige, das Euter treffende Läsionen für die sezernierenden Zellen als Reiz wirken und sie zu vermehrter Produktion von Enzymen, speziell auch der Reduktase, anstacheln. Wir treffen deshalb in diesem Zeitpunkt (Anfangsstadium der Euterentzündung) ein rasches, zuweilen ein abnorm rasches Eintreten der Reaktion. Handelt es sich um sehr heftige Euterentzündungen, so wird früher oder später eine Lähmung oder Vernichtung der betroffenen Zellen eintreten; die Produktion von Reduktase ist herabgesetzt oder hört ganz auf; gleichzeitig mischen sich dem Sekret Entzündungsprodukte, Blutbestandteile (Serum, Leukocyten usw.) bei. Die Folge ist eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion (Kulminationspunkt der Euterentzündung). Erst wenn die Entzündung ihren Höhepunkt überschritten hat und der Prozeß der Heilung sich zuwendet, erholen sich die Zellen wieder bzw. treten an Stelle der zugrunde gegangenen Zellen neue; es wird wieder Reduktase abgeschieden, und die Milch erlangt nach kürzerer oder längerer Zeit ihren früheren Gehalt an Schardinger-Enzym wieder oder weist sogar einen höheren Enzymgehalt gegen früher auf (Stadium der Heilung). Ob diese Auffassung richtig ist und wie groß der Anteil an der Veränderung der Reaktion ist, der dem durch die Entzündung veranlaßten Übertritt von Blutbestandteilen in die Milch zukommt, müssen wir vorerst noch dahingestellt sein lassen.

Aus unseren Ausführungen ergeben sich nachstehende

Schlußfolgerungen:

1. Das Auftreten einer Euterentzündung beeinflußt den Gehalt der Milch an Schardinger-Enzym.

2. Der Enzymgehalt ist in erster Linie von dem Grade der Veränderung des Sekrets, sowie von der Ausdehnung, dem Grade und dem Stadium der Entzündung abhängig.

3. Solange das Mastitissekret normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, pflegt die Reaktionszeit normal oder verkürzt zu sein.

4. Bei sehr starker Veränderung, insbesondere bei seröswässeriger Beschaffenheit des Sekrets ist eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion festzustellen.

5. Mastitismilch zeigt große Schwankungen im Enzymgehalt.

6. Die Schardingersche Probe eignet sich nicht zur Ermittlung euterkranker Kühe.

Über die Hitzekoagulation der Proteine.

I. Mitteilung.

Wird die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung durch die Koagulation geändert?[1])

Von

S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen.

(Aus dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 22. Februar 1911.)

Bei biologisch-chemischen Untersuchungen liegt oft die Aufgabe vor, die koagulablen Proteine aus einer Lösung zu entfernen. Das herkömmliche Verfahren in solchen Fällen ist, wie bekannt, durch Erhitzen der mit einer reichlichen Menge eines angemessenen Salzes versetzten, ganz schwach sauren Lösung den genuinen Proteinstoff in koagulierter Form auszuscheiden. Es handelt sich indessen gewöhnlich um den Nachweis oder vielleicht gar um die quantitative Bestimmung nicht koagulabler Körper, deren nähere Untersuchung erst durch das Wegschaffen des genuinen Proteins ermöglicht wird, und selbstverständlich ist daher ein Zusatz von fremden Stoffen, z. B. Salzen, beim Koagulationsprozesse soweit als möglich zu vermeiden. Andererseits ist es eine altbekannte Sache, daß salzfreie oder salzarme Proteinlösungen nicht zu vollständiger Koagulation gebracht werden können, wenn nicht der richtige Grad von Säuerung ganz genau getroffen wird.

Die von L. Michaelis und P. Rona[2]) vorgeschlagene Ausfällung von genuinen Proteinstoffen durch Mastix oder andere kolloidale Stoffe

---

[1]) Wird gleichzeitig in französischer Sprache in den Compt. rend. du Lab. de Carlsberg 10, 1, 1911 veröffentlicht.

[2]) Diese Zeitschr. 2, 219, 1906; 3, 109, 1906; 4, 11, 1907; 5, 365, 1907; 6, 1, 1907; 7, 329 und 488, 1907; 8, 356, 1908.

ist daher als ein wesentlicher Fortschritt zu verzeichnen und leistet auch in vielen Fällen gute Dienste, besonders wenn Cupriacetat, dessen Metall nachher mittels Schwefelwasserstoff entfernt werden kann, als Elektrolyt benutzt wird. Immerhin kann es aber doch kaum zweifelhaft sein, daß das natürlichste Verfahren, koagulable Proteinstoffe wegzuschaffen, eine Koagulation sein muß, wenn es nur gelingt, eine solche Operation ohne Zugabe wesentlicher Mengen von Salzen oder anderen Fremdkörpern in zufriedenstellender Weise durchzuführen. Es werden nämlich dadurch wahrscheinlich nur die wirklich koagulierbaren Stoffe ausgeschieden werden, während eine jegliche Fällungsmethode, auch die von Michaelis und Rona vorgeschlagene, es kaum vermeidet, nicht koagulierbare Körper zusammen mit den koagulierbaren zu fällen.

Ausgehend von derartigen Betrachtungen und im Anschluß an verwandte, hier im Laboratorium ausgeführte Arbeiten, fingen wir vor ein paar Jahren eine Untersuchung über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration beim Koagulierungsprozesse an. Es hat sich dabei in guter Übereinstimmung mit dem oben Angeführten herausgestellt, daß es, um eine vollständige Koagulation zu erhalten, von der allergrößten Bedeutung war, die Wasserstoffionenkonzentration der betreffenden Lösung innerhalb recht eng bemessener Grenzen zu halten, und zwar besonders, wenn die Lösung arm an Salz war. Zu gleicher Zeit hat es sich aber auch gezeigt, daß es möglich ist, eine ebenso vollständige, ja gar noch vollständigere — oder jedenfalls eine schnellere — Koagulation ohne Salzzugabe als mit derselben zu erreichen, wenn man nur dafür Sorge trug, bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration zu arbeiten. Diese letztgenannte Größe hat, wenn die sonstigen Versuchsbedingungen (Konzentration der Proteinlösung, Salzgehalt derselben, Koagulationsdauer) konstant gehalten werden, einen konstanten Wert, der von der Art und Beschaffenheit der für die Säuerung angewandten Säure unabhängig ist. Bei den von uns gewöhnlich benutzten Versuchsbedingungen entspricht die optimale Wasserstoffionenkonzentration, sowohl was Blutserum, als auch was Eiereiweiß betrifft (die einzigen zwei Proteinstofflösungen, mit denen wir bisher gearbeitet haben), dem Wasserstoffionenexponenten p_H = ca. 4,7[1]). Von einem absolut konstanten Wert für die optimale Wasserstoffionenkonzentration des Koagulationsprozesses kann jedoch nicht die Rede sein, indem dieser, wie im experimentellen Teil (siehe S. 419 und S. 431) näher besprochen wird, sowohl von der Konzentration des Proteinstoffes als auch vom Salzgehalt der Lösung abhängt.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration in genauem Zusammenhang steht mit dem sogenannten „isoelektrischen Punkt" der Proteinstoffe, über dessen Bedeutung und Lage eine Reihe in den letzten zwei Jahren veröffentlichter Arbeiten von L. Michaelis, P. Rona, B. Mostynski und H. David-

[1]) Betreffs der Bedeutung der Größe p_H verweisen wir auf diese Zeitschr. 21, 159, 1909.

sohn[1]) neue und wichtige Aufschlüsse gebracht haben. Nach den von Michaelis und Rona geäußerten Anschauungen über das Wesen des Koagulationsprozesses muß man erwarten, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation mit derjenigen Wasserstoffionenkonzentration zusammenfalle, die dem isoelektrischen Punkte des betreffenden Proteinstoffes entspricht. Die von uns erhaltenen Resultate scheinen nicht ganz diese Auffassung zu bestätigen. Während nämlich der „isoelektrische Punkt" laut der theoretischen Begründung Michaelis'[2]) eine konstante Größe sein muß, so ist nach den Ergebnissen unserer Versuche die Optimal-Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation, wie schon oben gesagt, sowohl von der Konzentration der Proteinstofflösung als auch von ihrem Salzgehalt abhängig. Unsere Versuchsresultate stimmen zunächst mit der von W. Pauli und R. Wagner[3]) jüngst vertretenen Betrachtungsweise überein, laut der die Bestimmung der optimalen Koagulationsbedingungen von Michaelis und seinen Mitarbeitern hauptsächlich auf eine Neutralisation anwesender alkalischer Stoffe hinausläuft. Auch unsere Versuche haben nämlich zu einer ähnlichen Auffassung geführt, indem wir, wie es im experimentellen Teil (S. 428) näher dargetan wird, Grund haben, anzunehmen, daß die für die Koagulation einer reinen Proteinlösung optimale Wasserstoffionenkonzentration im wesentlichen von dem dem Proteinstoff eigenen sauren Charakter herrührt und deshalb von der Proteinkonzentration abhängig sein muß.

Mit der Frage nach der für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration eng verknüpft steht der Hauptgegenstand dieser Abhandlung, die Frage nach der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation. Diese Frage ist unseres Wissens früher nicht genau untersucht worden; es ist aber eine landläufige Annahme, daß die Reaktion der Lösung während der Koagulation gegen die alkalische Seite hin verschoben wird. In dem bekannten Buche O. Cohnheims: „Chemie der Eiweißkörper" (1904) wird dieses Verhältnis in den folgenden Worten erwähnt (S. 132): „Beim Koagulieren einer beliebigen Eiweißlösung, die irgendwelche Salze, Säuren oder Basen enthält, verschiebt sich die Reaktion nach der alkalischen Seite, so daß eine neutrale oder selbst schwach saure Lösung beim Kochen deutlich alkalisch wird. Der Grund ist unbekannt." Im Gegensatz hierzu

---

[1]) Diese Zeitschr. 19, 181, 1909; 24, 79, 1910; 25, 401, 1910; 27, 38, 1910; 28, 1 und 193, 1910; 29, 494, 1910 und 30, 143, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 19, 184, 1909 und 24, 80, 1910.

[3]) Diese Zeitschr. 27, 300, 1910.

meinen Michaelis und Rona[1]), daß bei der Koagulation von Serum, unter gebührender Rücksicht der anwesenden Kohlensäure, keine Reaktionsänderung stattfindet: „Beim Denaturieren des Serums durch Hitze mit oder ohne Gerinnung ändert sich, wenn man die Austreibung von CO_2 verhindert, die nach dem Erkalten bestimmte Reaktion nicht, und ebenso wenig das Säurebindungsvermögen des Serums" (l. c. S. 339). Aus dem Zahlenmaterial Michaelis und Ronas geht indessen hervor, daß sie nur in einem einzigen Falle die Koagulation bei einer in der Nähe der optimalen liegenden Wasserstoffionenkonzentration vorgenommen haben; bei diesem Versuch (Nr. 1, S. 336) haben sie übrigens eine ausgeprägte Reaktionsänderung in alkalischer Richtung erhalten. In allen übrigen Versuchen, wo die Wasserstoffionenkonzentration Erwähnung findet, ist die Reaktion schwach alkalisch gewesen; unter solchen Umständen wird aber die Koagulation jedenfalls nur unvollständig sein, und daneben werden unzweifelhaft mehr oder weniger tiefgreifende Spaltungen des Proteinstoffes während des Erhitzens vor sich gehen.

Wünscht man zuverlässige Auskünfte über die hier behandelte Frage zu bekommen, dann muß man die Koagulation in solcher Weise vorgehen lassen, daß die Ausscheidung möglichst vollständig wird; das heißt zunächst, daß die Wasserstoffionenkonzentration die optimale sein muß. Einige in dieser Weise teils mit Serum und teils mit Eiereiweiß ausgeführte Versuchsreihen bilden den Hauptinhalt dieser Abhandlung. Wie im experimentellen Teil genauer erwähnt wird, haben wir für jede einzelne Versuchsreihe erst durch Vorversuche ermittelt, welche Menge der angewandten Säuren (Salzsäure, Milchsäure, Essigsäure oder Schwefelsäure) bei den gewählten Versuchsbedingungen (Proteinkonzentration, Salzgehalt usw.) erforderlich war, um der zu koagulierenden Flüssigkeit die optimale Wasserstoffionenkonzentration zu erteilen. Beim Hauptversuch wurde die Koagulation dann eben unter den optimalen Bedingungen vorgenommen und die Wasserstoffionenkonzentration sowohl vor als auch nach der Koagulation gemessen.

[1]) Diese Zeitschr. 18, 336, 1909.

Es hat sich bei diesen Versuchen herausgestellt, daß die Hitzekoagulation des Proteins immer mit einer Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung verbunden ist.

Außerdem hat sich ergeben, daß die Größe der Wasserstoffionenkonzentrationsänderung von der angewandten Säure abhängig ist; im großen und ganzen ist die Änderung um so größer, je stärker die benutzte Säure ist.

Wie im experimentellen Teil ausführlich besprochen werden wird, finden diese Verhältnisse eine einfache und ungezwungene Erklärung durch die oben angeführte Auffassung der Optimal-Wasserstoffionenkonzentration als derjenigen Konzentration der Wasserstoffionen, die der reine Proteinstoff der Lösung mitteilt. Die Reaktionsverschiebung wird demnach einfacherweise als ein Ausschlag der Änderung der Proteinkonzentration der Lösung aufzufassen sein. (Siehe übrigens S. 428.)

Im folgenden experimentellen Teil beschreiben wir unter Abschnitt A einige Versuchsreihen, die das Verfahren zeigen, das von uns befolgt wurde, um die für die Koagulation der Serum- und der Eiereiweißlösung optimalen Bedingungen festzulegen.

Im Abschnitt B wird die Frage nach der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation behandelt.

Schließlich erwähnen wir im Abschnitt C ein sonderbares und unseres Wissens bisher noch nicht beobachtetes Verhalten bei der Hitzekoagulation einer Eiweißlösung, und teilen einige diesbezügliche Versuchsreihen mit. Während das Serum schon nach $^1/_4$ bis $^1/_2$stündigem Erhitzen in siedendem Wasser vollständig auskoaguliert ist, so verhalten sich Eiweißlösungen, selbst unter den günstigsten Koagulationsbedingungen, ganz anders. Wenn man, nachdem die erste, reichliche Koagulation stattgefunden hat, fortfährt, die Flüssigkeit mit dem Gerinnsel weiter zu erhitzen, so scheidet sich allmählich mehr und mehr aus, bis das Maximum im Laufe einiger Stunden erreicht wird, wonach die spaltende und lösende Wirkung der Flüssigkeit auf das Gerinnsel dermaßen überhand nimmt, daß die Menge der

nicht koagulierten Stickstoffkörper bei weiterem Erhitzen wieder zunimmt. Wird dagegen das bei $^1/_2$stündigem Erhitzen in siedendem Wasser gebildete Gerinnsel abfiltriert, so bleibt das Filtrat bei nochmaliger Erwärmung vollständig oder doch so gut wie vollständig klar.

A. Die optimalen Koagulationsbedingungen.

Eines der Probleme, für deren Lösung eine wirklich unanfechtbare Methode zur Wegschaffung koagulabler Proteine von der allergrößten Bedeutung sein wird, ist die Frage nach dem „Reststickstoff des Blutes". Diese Frage, deren richtige Beantwortung unter anderem für das Verständnis der ganzen Stickstoffumsetzung im Organismus ausschlaggebend ist, ist Gegenstand sehr vieler Untersuchungen gewesen; die erhaltenen Ergebnisse widersprechen sich aber oft. Das ist nicht zum wenigsten den großen Schwierigkeiten zu verdanken, die sich einer quantitativen Trennung der koagulablen und nicht koagulablen stickstoffhaltigen Bestandteile des Blutes entgegenstellen. Eine nähere Besprechung der diesbezüglichen Untersuchungen gehört aber nicht hierher, und es würde auch zu weit führen, die bei der Ausscheidung der koagulablen Bestandteile des Blutes von den verschiedenen Forschern befolgte Methodik zu beschreiben. Es ist dies auch um so weniger notwendig, als H. Hohlweg und H. Meyer vor ein paar Jahren in der Einleitung zu ihrer schönen Arbeit: „Quantitative Untersuchungen über den Reststickstoff des Blutes"[1]) eine Übersicht über diese Fragen gegeben haben.

Die von Hohlweg und Meyer selbst benutzte Methode, deren Brauchbarkeit sie durch eine Reihe Kontrollbestimmungen bewiesen, war seinen Hauptzügen nach die folgende. Es wurde Serum mit einem Gemisch gleicher Teile 1%iger Essigsäure und 5%iger primärer Kaliumphosphatlösung so lange versetzt, bis die Reaktion Lackmus gegenüber sauer wurde, während sie gegen Kongo noch neutral blieb; dann wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung verdünnt und koaguliert. Gewöhnlich wurden 50 ccm Serum mit 50 ccm des Gemisches von Essigsäure und Kaliumphosphat versetzt und mit 300 ccm Wasser und 400 ccm gesättigter Kochsalzlösung verdünnt.

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 381, 1908.

Das Verfahren ist mit den gewöhnlichen Nachteilen der Koagulationsmethoden behaftet, die mit dem großen Salzgehalt der Lösung und mit der unsicheren Bestimmung der optimalen Menge des Säuerungsmittels in Zusammenhang stehen. Das Säuerungsmittel ist zwar von einer solchen Beschaffenheit gewählt worden, daß ein kleiner Überschuß kaum von wesentlicher Bedeutung sein kann; auf der anderen Seite aber ist die Bestimmung des „Wieviel" weit davon entfernt, scharf zu sein. Hohlweg und Meyer machen selbst ausdrücklich darauf aufmerksam (l. c. S. 387): „Der Spielraum vom Auftreten der sauren Reaktion gegen Lackmus bis zum Auftreten einer Kongoreaktion ist allerdings ein ziemlich großer, somit die Bezeichnung ‚gegen Lackmus sauer, gegen Kongo noch neutral' keine sehr scharfe."

Um diese Sachlage etwas näher zu beleuchten, werden wir die Einzelheiten einer von uns ausgeführten Versuchsreihe mit Pferdeblutserum anführen:

Zu 20 ccm Serum wurde unter Umrühren das von Hohlweg und Meyer empfohlene Gemisch von 1%iger Essigsäure und 5%iger Kaliumphosphatlösung getröpfelt.

Nach Zusatz von 3 ccm war die Reaktion gegen Lackmuspapier schwach sauer, von 4 ccm ausgesprochen sauer, von 6 ccm stark sauer und von 10 ccm sehr stark sauer; aber selbst nach Zugabe von 50 ccm der Essigsäure-Phosphatmischung war die Reaktion des Serums nicht sauer gegen Kongopapier. Das ist an und für sich ganz natürlich, wenn man sich erinnert, daß Kongo in Gegenwart genuiner Proteine ein ganz unbrauchbarer Indicator ist;[1]) es zeigt aber gleichzeitig die der Festlegung der optimalen Menge des Säuerungsmittels anhaftende Unsicherheit.

Wir machten sodann eine Reihe Koagulationsversuche genau mit den von Hohlweg und Meyer angewandten Verdünnungsverhältnissen. In Kolben von Jenaglas wurden gebracht 20 ccm Serum, a ccm der Essigsäure-Phosphatmischung, (140 — a) ccm Wasser und 160 ccm gesättigte Chlornatriumlösung. Dann wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert, wonach die Kolben in kaltes Wasser gestellt wurden; am folgenden Tage wurde filtriert und der Gesamtstickstoff in

[1]) Siehe diese Zeitschr. 21, 217, 1909.

200 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Hinsichtlich der in jedem einzelnen Versuche angewandten Menge des Essigsäure-Phosphatgemisches war die Tatsache für uns maßgebend, daß eine Zugabe von 10 ccm des Gemisches hinreichte, um dem Serum eine sehr stark saure Reaktion gegen Lackmus zu erteilen, und daß andernteils Hohlweg und Meyer gleiche Raumteile von Serum und Säuerungsgemisch als für gewöhnlich passend angeben. Da das Erhitzen aller Kolben zu gleicher Zeit und unter gleichen Umständen vor sich ging, so ist die Verdampfung des Wassers während der Koagulation für den Vergleich ohne Belang; eine Kontrollwägung hat übrigens gezeigt, daß in jedem Versuche etwa 4 g Wasser verdampft waren. Die Versuchsresultate gehen aus der Tabelle I hervor; beim Ausrechnen der Zahlen des letzten Stabes ist auf das verdampfte Wasser Rücksicht genommen, dagegen aber nicht, weder hier noch bei späteren Versuchen, auf das Volumen des Gerinnsels.

Aus der Tabelle I ist zunächst ersichtlich, daß 10 ccm (Versuch Nr. 1) des Essigsäure-Phosphatgemisches bei weitem nicht hinreichen, um die optimalen Koagulationsbedingungen zuwege zu bringen; trotzdem, wie oben erwähnt, eine solche Zugabe dem Serum eine sehr stark saure Reaktion Lackmuspapier gegenüber erteilt. Ja, selbst nicht das von Hohlweg und Meyer benutzte Verhältnis, gleiche Raumteile Serum und Säuerungsgemisch (Versuch Nr. 5), gibt die optimalen Bedingungen; diese werden erst mit der Anwendung von 23 ccm der Essigsäure-Phosphatmischung erreicht.

Tabelle I.
Koagulation von Serum nach Hohlweg und Meyer.
20 ccm Serum: 233,0 mg Gesamtstickstoff.

Versuchsnummer	Angewandte Menge (a) der Essigsäure-Phosphatmischung ccm	Gesamtstickstoff der nicht koagulierten Stoffe	
		in 200 ccm des Filtrats mg	in 20 ccm Serum mg
1	10	5,59	8,83
2	14	4,79	7,57
3	17	4,84	7,65
4	19	4,76	7,52
5	20	4,73	7,47
6	21	4,56	7,20
7	23	3,95	6,24
8	25	4,19	6,62

Die nächste Frage, die sich dann erhob, war diese: Ist es möglich, ohne Salzzusatz, nur mittels passender Säuerung, eine ebenso vollständige Ausscheidung der koagulablen, stickstoffhaltigen Bestandteile des Serums zu erreichen als nach dem Verfahren von Hohlweg und Meyer? Um diese Frage zu beantworten, wurden 3 Versuchsreihen angestellt mit derselben Art von Serum als die, die bei der Koagulation nach Hohlweg und Meyer benutzt wurde.

In 100-Kubikzentimeter-Meßkolben wurden abpipettiert je 20 ccm Serum, a ccm Säure (Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure) nebst (55 — a) ccm Wasser. Danach wurde genau 15 Minuten in siedendem Wasser erhitzt und die Kolben nachher in Wasser gekühlt; nach Stehenlassen bis zum nächsten Tag wurde mit Wasser bis zur Marke verdünnt und dann nach gutem und wiederholtem Schütteln und erneuertem Stehenlassen nach 3 bis 4 Stunden filtriert. Der Gesamtstickstoff wurde in 50 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Koagulation von Serum nach Zugabe von Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure.

20 ccm Serum: 233,0 mg Gesamtstickstoff.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) von Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Gesamtstickstoff der nicht koagulierten Verbindungen					
		in 50 ccm des Filtrats nach Säuerung mittels			in 20 ccm Serum nach Säuerung mittels		
		Salzsäure mg	Schwefelsäure mg	Essigsäure mg	Salzsäure mg	Schwefelsäure mg	Essigsäure mg
9	7	3,75	3,92	4,05	7,50	7,84	8,10
10	8	3,25	3,38	3,54	6,50	6,76	7,08
11	9	3,20	3,26	3,23	6,40	6,52	6,46
12	10	3,16	3,27	3,18	6,32	6,54	6,36
13	11	3,46	3,35	3,15	6,92	6,70	6,30
14	12	u. K. [1])	3,35	3,23	—	6,70	6,46
15	13	—	3,46	3,31	—	6,92	6,62
16	14	—	3,98	3,45	—	7,96	6,90

Aus der Tabelle ist zunächst zu ersehen, daß es möglich ist, durch einfache Säuerung und Koagulation bis auf praktisch genommen ebenso kleine Werte des Gehalts an nicht koagulablen Stickstoffkörpern herunter zu kommen, als mittels des

[1]) Unvollständige Koagulation.

Verfahrens nach Hohlweg und Meyer: ja, die Optimalzone scheint sogar, besonders bei Anwendung von Essigsäure, breiter zu sein als beim Versuche nach Hohlweg und Meyer. In jedem Falle müssen die optimalen Bedingungen experimentell ermittelt werden.

Die optimale Säuremenge ist in den hier besprochenen Versuchen ungefähr die gleiche bei jeder der 3 Säuren; wir machen auf dieses Verhältnis aufmerksam, weil wir sonst alles übrige gleich, immer die optimale Säuremenge der Essigsäure ein wenig größer als die der zwei anderen Säuren gefunden haben.

Endlich zeigt die Tabelle deutlich den Unterschied zwischen der Wirkungsweise einer starken und der einer schwachen Säure (bzw. Salzsäure und Essigsäure; die Schwefelsäure fügt sich natürlich dazwischen ein). Ein Defizit des Säuerungsmittels — die Versuche 9 und 10 — verursacht einen kleineren Fehler bei der Koagulation, wenn Salzsäure, als wenn Essigsäure verwendet wird. Bei einem Überschuß von Säure — Versuche 14, 15 und 16 — ist das Verhältnis gerade das umgekehrte; während auch nur ein ganz kleiner Überschuß von Salzsäure eine geradezu sichtbar unvollständige Koagulation verursacht, geben selbst einige Kubikzentimeter überschüssiger Essigsäure nur einen geringen Koagulationsfehler. Dieses leicht erklärliche, aber wichtige und interessante Verhältnis haben wir bei zahlreichen Versuchen immer wieder getroffen.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren haben wir stets die für die Koagulation optimale Säuremenge ermittelt. Im folgenden Abschnitt wird man zahlreiche Beispiele von Versuchsreihen dieser Art finden, und wir beschränken uns deshalb hier darauf, nur noch ein paar mit Eiereiweiß ausgeführte Reihen anzuführen, die den Einfluß beleuchten, den ein Zusatz von Kochsalz auf den Verlauf der Koagulation ausübt.

Für jeden Versuch wurden angewandt: 50 ccm etwa 4%ige Lösung rohen Eiereiweißes[1]), a ccm 0,1 n-Salzsäure, nebst, in der ersten Reihe, (20 — a) ccm Wasser und, in der zweiten Reihe, 5 ccm 2 n-Natriumchloridlösung + (15 — a) ccm Wasser. Das Volumen war somit während der Koagulation

[1]) Nach dem üblichen Verfahren hergestellt (siehe diese Zeitschr. 7, 90, 1907).

70 ccm in beiden Reihen. Es wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert und übrigens ganz wie oben beschrieben gearbeitet. Die Resultate finden sich in der Tabelle III.

Tabelle III.

Koagulation einer Lösung von Eiereiweiß nach dem Ansäuern mit Salzsäure ohne oder mit Zugabe von Natriumchlorid.

50 ccm Eiweißlösung: 261 mg Gesamtstickstoff.

Erste Reihe (ohne Salzzugabe)			Zweite Reihe (mit Salzzugabe)		
Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
17	9,0	14,58	24	9,0	16,80
18	9,5	13,54	25	9,5	16,50
19	10,0	12,21	26	10,0	16,38
20	10,5	11,95	27	10,5	16,20
21	11,0	12,51	28	11,0	16,10
22	11,5	13,76	29	11,5	16,13
23	12,0	14,69	30	12,0	16,08
—	—	—	31	12,5	16,28
—	—	—	32	13,0	16,33

Aus der Tabelle III geht hervor:

1. daß der Optimalpunkt, der in der ersten Reihe bei einem Säurezusatz von 10,5 ccm gefunden wird (Versuch Nr. 20), durch die Zugabe von Salz gegen die saure Seite hin verschoben wird, indem die optimale Säuremenge in der zweiten Reihe gleich 11,5 ccm gesetzt werden muß (Versuch Nr. 29). Elektrometrische Messungen haben für das Gemisch im Versuch Nr. 20 eine Wasserstoffionenkonzentration, dem $p_H = 4{,}65$ entsprechend, ergeben, während die Messung für den Versuch Nr. 29 $p_H = 4{,}52$ ergab;

2. daß die Lage des Optimalpunktes in der ersten Reihe weit schärfer ausgesprochen ist als in der zweiten; in dieser letzteren liegt eher eine Optimalzone vor. Die Salzzugabe bewirkt somit, daß Abweichungen von der optimalen Säuremenge von geringerem Belang werden; man ersieht aber zugleich,

3. daß das Filtrat der zweiten Versuchsreihe weit mehr Stickstoff enthält als das der ersten. Der Zusatz von Salz hat somit eine weniger vollständige oder jedenfalls eine langsamere Koagulation bewirkt (vgl. Abschnitt C).

B. Die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration bei der Koagulation.

a) Schon in der Einleitung sind sowohl die bei diesen Versuchen befolgte Methode als auch die dadurch erhaltenen Resultate in Kürze auseinandergesetzt worden. Zur näheren Beleuchtung der Einzelheiten des Verfahrens soll hier ein einzelner Versuch ausführlich beschrieben werden.

350 ccm einer ca. 4%igen Lösung rohen Hühnereiweißes wurden mit 10 ccm n-Salzsäure versetzt und dann von einem Tag bis zum anderen Wasserstoff durchgeleitet, um die Kohlensäure auszutreiben. Die Zugabe von Säure war so gewählt, daß die Konzentration der Wasserstoffionen, die durch elektrometrische Messung dem $p_{H} = 3{,}89$ entsprechend ermittelt wurde, einerseits dazu ausreichte, daß alle Kohlensäure wirklich ausgetrieben werden konnte, andererseits aber doch nicht so groß wurde, daß eine wesentliche Acidalbuminbildung durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur zu befürchten wäre.

Für die so hergestellte Lösung wurden die optimalen Versuchsbedingungen in der im vorigen Abschnitt erwähnten Weise ermittelt. In 100-ccm-Meßkolben wurden abpipettiert je 50 ccm der sauren Eiweißlösung (13,9 ccm 0,1 n-Salzsäure enthaltend), a ccm 0,1 n-Natriumhydroxydlösung und (6 — a) ccm Wasser, indem das Flüssigkeitsvolumen bei diesem und den folgenden Versuchen 56 ccm betrug. Danach wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert und in Wasser abgekühlt. Am nächsten Tage wurde mit Wasser bis auf die Marke verdünnt, nach reichlichem und wiederholtem Schütteln und nochmaligem Stehenlassen nach 3 bis 4 Stunden filtriert und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Es erhellt aus der Tabelle IV, daß man die optimalen Koagulationsbedingungen in Versuch 2 gehabt hat. Zufolge dessen wurde der Hauptversuch folgenderweise angestellt: 700 ccm der oben genannten, ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 20 ccm n-Salzsäure versetzt und über Nacht ein Wasserstoffstrom durch die Mischung geleitet. Die Hauptlösung wurde dargestellt aus

500 ccm der sauren, mit Wasserstoff behandelten Eiweißlösung,
41 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung,
19 „ Wasser,

zusammen 560 ccm.

300 ccm dieser Flüssigkeit wurden durch $^1/_2$stündiges Erhitzen in einem mit Rückflußkühler versehenen Jenakolben in siedendem Wasser koaguliert. Der Kolben wurde vor und nach der Koagulation gewogen, der Verlust betrug nur 0,15 g; nach der Abkühlung wurden deshalb 3 Tropfen Wasser zugegeben. Nach Abkühlung, wiederholtem Schütteln und Stehenlassen bis zum nächsten Tage wurde filtriert.

Tabelle IV.

Koagulation von Eiereiweißlösung nach Zugabe von Salzsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Natriumhydroxydlösung ccm	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte 0,1 n-Salzsäure (13,9 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
1	4,6	9,3	13,45
2	4,1	9,8	11,53
3	3,6	10,3	12,15
4	3,1	10,8	14,12
5	2,6	11,3	unvollständige Koagulation

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde in der früher beschriebenen Weise[1]) elektrometrisch gemessen, und zwar sowohl in der Hauptportion vor der Koagulation, als auch im Filtrat nach derselben; der Gesamtstickstoff derselben 2 Lösungen wurde ebenfalls nach Kjeldahl bestimmt.

Die Wasserstoffionenkonzentration vor der Koagulation entsprach dem $p_{H'} = 4{,}60$, die des Filtrats dagegen $p_{H'} = 5{,}21$.

50 ccm der Hauptlösung enthielten 249 mg N,
50 „ des Filtrats „ 19,75 „ N,

was 7,93% der ganzen Stickstoffmenge entspricht.

Wir möchten die Aufmerksamkeit darauf lenken, daß im Versuch Nr. 2, Tabelle IV, 50 ccm des Filtrats, 28 ccm der Hauptlösung entsprechend, 11,53 mg Stickstoff enthielten. Dem-

[1]) Diese Zeitschr. 21, 150, 1909.

entsprechend sollten im Hauptversuche, wo keine Verdünnung stattfand, 50 ccm des Filtrats $11{,}53 \times \frac{50}{28} = 20{,}59$ mg Stickstoff enthalten; es sind indessen nur 19,75 mg gefunden worden. Das rührt, wie direkte Kontrollversuche uns gelehrt haben, nicht davon her, daß das bei den Vorversuchen zugesetzte Wasser etwas vom Gerinnsel wieder auflöst, sondern hat seine Ursache in der verschiedenen Koagulationsdauer. In allen Vorversuchen haben wir nur 15 Minuten erwärmt, in den Hauptversuchen dagegen haben wir, der größeren Flüssigkeitsmenge wegen, $^1/_2$ Stunde erhitzt. Das spielt, wie schon in der Einleitung (S. 401) erwähnt worden ist und wie in einem folgenden Abschnitt näher erörtert werden soll, bei der Koagulation von Eiereiweiß eine Rolle, dagegen aber nicht bei derjenigen des Serums. Für sämtliche im folgenden angeführten Versuche wird eine einfache Rechnung die Richtigkeit des hier Angeführten bestätigen.

Ganz wie hier beschrieben, aber mit anderen Eiweißlösungen wurden entsprechende Versuche mit Schwefelsäure bzw. Milchsäure oder Essigsäure als Säuerungsmittel ausgeführt. Die Resultate der Vorversuche sind in der Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

Koagulation von Eiereiweißlösung nach der Zugabe von Schwefelsäure, bzw. Milchsäure oder Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Schwefelsäure (13,9 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Milchsäure (12,5 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Essigsäure (20,6 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
6	7,8	15,24	11	8,0	12,18	18	16,6	10,77
7	8,8	14,14	12	9,0	11,08	19	17,6	10,21
8	9,3	13,87	13	9,5	10,13	20	18,6	10,25
9	9,8	13,88	14	10,0	10,03	21	19,6	10,20
10	10,8	14,05	15	10,5	10,25	22	20,6	10,56
—	—	—	16	11,0	10,95	—	—	—
—	—	—	17	12,0	11,75	—	—	—

Auf Grund dieser vorläufigen Versuche wurden dann die Hauptversuche mit folgenden Lösungen und mit folgenden Ergebnissen ausgeführt:

Ansäuern mittels Schwefelsäure.

700 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 20 ccm n-Schwefelsäure versetzt und dann Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
43,5 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Der Optimalpunkt ist inmitten der Versuche Nr. 8 und 9 angenommen
16,5 „ Wasser }
560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H\cdot} = 4{,}68$
Nach „ „ $p_{H\cdot} = 5{,}51$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 244 mg N
50 „ des Filtrats „ 23,9 „ „
(= 9,80% des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Milchsäure.

630 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 90 ccm 0,2 n-Milchsäure versetzt und Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
25 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 14 liegend angenommen
35 „ Wasser }
560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H\cdot} = 4{,}69$
Nach „ „ $p_{H\cdot} = 4{,}92$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 210 mg N
50 „ des Filtrats „ 15,3 „ „
(= 7,29% des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

500 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 130 ccm 0,2 n-Essigsäure versetzt und Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
20 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 20 liegend angenommen
40 „ Wasser }
560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H\cdot} = 4{,}69$
Nach „ „ $p_{H\cdot} = 4{,}76$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 199 mg N
50 „ des Filtrats „ 15,9 „ „
(= 7,99% des Gesamtstickstoffs).

Ganz ähnliche Resultate bekamen wir, selbst wenn die vorläufigen Versuche ohne vorhergehende Durchleitung von Wasserstoff durch die saure Flüssigkeit ausgeführt wurden und die Hauptportion während der Wasserstoffdurchleitung nur die bei den Vorversuchen ermittelte optimale Säuremenge enthielt. Ein Beispiel, in dem Salzsäure als Säuerungsmittel diente, sei angeführt.

Die vorläufigen Versuche wurden mit 50 ccm ca. 4%iger, nicht „hydrogenisierter" Eiweißlösung, a ccm 0,1 n-Salzsäure und (20 — a) ccm Wasser ausgeführt. Das Volumen während der Koagulation war somit 70 ccm; es wurde, wie üblich, auf 100 ccm aufgefüllt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt. Das Resultat der Versuche findet man in der Tabelle VI.

Tabelle VI.

Koagulation von Eiereiweißlösung nach Zugabe von Salzsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Angewandte Menge Wasser ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
23	9,5	10,5	12,45
24	10,0	10,0	11,58
25	10,5	9,5	11,69
26	11,0	9,0	12,93
27	11,5	8,5	13,85
28	12,0	8,0	14,55

Der Hauptversuch wurde danach mit der folgenden Lösung ausgeführt:

500 ccm ca. 4%ige Eiweißlösung
100 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 24 angenommen
100 „ Wasser }

Durch die Mischung wurde ein Wasserstoffstrom von einem Tage bis zum andern geleitet und dann filtriert.

Vor der Koagulation $p_{H'} = 4{,}69$
Nach „ „ $p_{H'} = 5{,}36$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 189 mg N
50 „ des Filtrats „ 14,1 „ „
(= 7,46% des Gesamtstickstoffs).

b) Versuche mit Eiweißlösungen, die mittels Dialyse von Salzen befreit waren. Eine ca. 4%ige Eiweißlösung wurde mit Salzsäure bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure schwach angesäuert und danach im Laufe etwa eines Monats

gegen reines, häufig erneuertes Wasser sorgfältig dialysiert. Als Membran diente Pergamentpapier, und um Fäulnis zu verhindern, wurde die Dialyse im Eisschrank vorgenommen und die Eiweißlösung während der Dialyse mit Toluol gesättigt und überschichtet. Nach Abschluß der Dialyse war in der mit Schwefelsäure angesäuerten Portion keine Schwefelsäure mehr nachweisbar, und in der mit Salzsäure versetzten Portion ließ sich nur eine ganz schwache Spur von Salzsäure erkennen. Nach wiederholtem Filtrieren verjagte man mittels eines Wasserstoffstroms den letzten Rest von Toluol aus den Eiweißlösungen, wonach diese zu ähnlichen Versuchen wie die oben beschriebenen benutzt wurden.

Die vorläufigen Versuche wurden mit 50 ccm Eiweißlösung, a ccm 0,1 n-Säure (bzw. Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure) nebst (15 — a) ccm Wasser angestellt. Das Volumen während der Koagulation war somit 65 ccm; wie üblich wurde bei den vorläufigen Versuchen 15 Minuten, bei den Hauptversuchen aber $^1/_2$ Stunde erhitzt. Gleichfalls, wie üblich, wurde nach dem Koagulieren auf 100 ccm verdünnt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt.

Die Resultate der vorläufigen Versuche sind in der Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Koagulation einer mit Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure versetzten, salzarmen Eiereiweißlösung.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Bemerkung	Versuchs-Nr.	Angew. Menge 0,1 n-Schwefelsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,1 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
29	2,0	—	Wegen Säurespaltung sehr unvollständige Koagulation	37	3,5	filtrierte sehr langsam	44	5,0	7,67
30	1,7	7,35	filtrierte gut	38	3,0	9,35	45	4,5	7,25
31	1,4	6,95	filtrierte besonders gut und schnell	39	2,5	8,77	46	4,0	7,25
32	1,1	8,66	filtrierte ziemlich gut	40	2,0	8,70	47	3,5	7,33
33	0,8	9,15	filtrierte langsam	41	1,5	9,87	48	3,0	7,77
34	0,5	—	filtrierte sehr langsam	42	1,0	10,65	49	2,5	8,55
35	0,2	—	ließ sich beinahe nicht filtrieren	43	0,5	koagulierte nicht	50	2,0	9,50
36	0,0	—	do.	—	—	—	51	1,0	10,97

Mit diesen Vorversuchen als Grundlage wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Ansäuern mittels Salzsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
14 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 31 liegend angenommen
136 „ Wasser }
650 ccm insgesamt.

Durch die Lösung wurde über Nacht ein Wasserstoffstrom geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H'} = 4{,}82$
Nach „ „ $p_{H'} = 5{,}45$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 126 mg N
50 „ des Filtrats „ 9,27 „ „
(= 7,36 % des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Schwefelsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
22,5 „ 0,1 n-Schwefelsäure } Optimalpunkt in der Mitte zwischen den Versuchen Nr. 39 und 40 angenommen
127,5 „ Wasser }
650 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H'} = 4{,}71$
Nach „ „ $p_{H'} = 5{,}25$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 142 mg N
50 „ des Filtrats „ 11,45 „ „
(= 8,06 % des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
40 „ 0,1 n-Essigsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 46 angenommen
110 „ Wasser }
650 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^\cdot} = 4{,}73$
Nach „ „ $p_{H^\cdot} = 4{,}78$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 135 mg N
50 „ des Filtrats „ 9,46 „ „
(= 7,01 % des Gesamtstickstoffs)

Die mitgeteilten Stickstoffbestimmungen der Hauptlösungen zeigen, daß hier etwas schwächere Eiweißlösungen vorliegen als diejenigen, mit denen die früher erwähnten Versuche gemacht wurden; selbst mit gebührender Rücksicht darauf ist es aber aus der Tabelle VII deutlich zu ersehen, wie klein die Säuremengen sind, die hinreichen, um salzarmen Eiweißlösungen die optimalen Koagulationsverhältnisse zu verleihen. Ebenfalls sieht man — natürlich besonders deutlich bei den Versuchen mit Salzsäure — wieviel kleine Änderungen in den zugefügten Säuremengen für den Verlauf der Koagulation bedeuten.

c) Versuche mit Eiweißlösungen verschiedener Konzentration. Es wurden 3 Versuchsreihen ausgeführt. Bei allen Vorversuchen war das Volumen während der Koagulation 70 ccm, die Mischung war aber in der ersten Reihe hergestellt aus:

50 ccm 4 %iger Eiweißlösung,
a „ 0,1 n-Salzsäure,
(20 — a) „ Wasser,

in der zweiten Reihe aus:

25 ccm 4 %iger Eiweißlösung,
a „ 0,02 n-Salzsäure,
(45 — a) „ Wasser,

in der dritten Reihe aus:

10 ccm 4 %iger Eiweißlösung,
a „ 0,02 n-Salzsäure,
(60 — a) „ Wasser.

Übrigens war das Verfahren das gewöhnliche; die Koagulationsdauer war 15 Minuten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII.

Koagulation von Eiereiweiß in verschiedener Konzentration; Ansäuern mittels Salzsäure.

50 ccm Eiweißlösung			25 ccm Eiweißlösung			10 ccm Eiweißlösung		
Versuchs-Nr.	Angew. Menge (a) Salzsäure 0,1 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure 0,02 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure 0,02 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
52	9,0	14,58	59	20,00	7,92	65	8,0	3,26
53	9,5	13,54	60	22,50	7,34	66	8,5	3,15
54	10,0	12,21	61	23,75	6,72	67	9,0	2,98
55	10,5	11,95	62	25,00	6,59	68	9,5	2,85
56	11,0	12,51	63	26,25	6,93	69	10,0	2,96
57	11,5	13,76	64	27,50	7,29	70	10,5	3,33
58	12,0	14,69	—	—	—	—	—	—

Auf diesen Vorversuchen fußend wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Die Hauptlösung des ersten Versuchs bestand aus:

250 ccm ca. 4%iger Eiweißlösung
52,5 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 55 angenommen
47,5 „ Wasser }
350 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde Wasserstoff durch die Lösung geleitet. Koagulationsdauer: $^1/_2$ Stunde.

Vor der Koagulation $p_H = 4{,}65$
Nach „ „ $p_H = 5{,}32$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 186 mg N
50 „ des Filtrats „ 14,38 „ „
(= 7,73% des Gesamtstickstoffs).

Die Hauptlösung des zweiten Versuchs bestand aus:

100 ccm ca. 4%iger Eiweißlösung
20 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 62 angenommen
160 „ Wasser }
280 ccm insgesamt.

Behandlung mit Wasserstoff und Koagulation wie oben.

Vor der Koagulation $p_H = 4{,}72$
Nach „ „ $p_H = 5{,}41$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 93,2 mg N
50 „ des Filtrats „ 7,98 „ „
(= 8,56% des Gesamtstickstoffs).

Die Hauptlösung des dritten Versuchs bestand aus:

50 ccm ca. 4%iger Eiweißlösung
47,5 „ 0,02 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 68 angenommen
252,5 „ Wasser }
350 ccm insgesamt.

Wasserstoffbehandlung und Koagulation wie oben.

Vor der Koagulation $p_H = 4{,}94$
Nach „ „ $p_H = 6{,}31$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 37,3 mg N
50 „ des Filtrats „ 3,98 „ „
(= 10,67% des Gesamtstickstoffs).

Aus der Tabelle VIII sowie auch aus den Ergebnissen der Hauptversuche erhellt:

1. Daß die optimale Säuremenge der angewandten Menge Eiweißlösung nicht völlig proportional ist, sondern ein klein wenig stärker als die Proteinkonzentration wächst.

2. Damit übereinstimmend ist die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration größer, p_H somit kleiner, bei starken als bei schwachen Eiweißlösungen (siehe S. 433).

3. Die Menge der nicht koagulierten Stickstoffverbindungen wächst nicht ganz proportional mit der Konzentration der Eiweißlösung, sondern wird bei den schwachen Lösungen verhältnismäßig am größten gefunden.

d) Versuche mit Pferdeblutserum. Schließlich mögen noch ein paar Versuchsreihen angeführt werden, in denen Pferdeblutserum zur Anwendung gekommen ist. In der einen Reihe wurde ein durch Hämoglobin etwas gefärbtes Serum und Salzsäure als Säuerungsmittel angewandt; in der anderen wurde ein rein gelbes Serum benutzt und mit Essigsäure angesäuert. Bei den vorläufigen Versuchen wurde in beiden Reihen 40 ccm Serum, a ccm 0,2 n-Salzsäure oder Essigsäure nebst (30 — a) ccm Wasser gebraucht. Das Volumen während der Koagulation war somit 70 ccm. Das Verfahren sonst wie üblich. Das Ergebnis der Vorversuche findet sich in der Tabelle IX (siehe S. 418) zusammengestellt.

Tabelle IX.

Koagulation von Pferdeblutserum nach Zugabe von Salzsäure bzw. Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,2 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,2 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
71	6	12,97	78	12	6,10
72	7	10,80	79	14	5,90
73	8	8,78	80	16	5,92
74	9	8,05	81	18	5,91
75	10	7,77	82	20	5,97
76	11	7,83	83	22	6,10
77	12	8,07	84	24	6,24

Auf Grund dieser Vorversuche wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Ansäuern mittels Salzsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

200 ccm Serum
52,5 „ 0,2 n-Salzsäure } Die Mitte zwischen den Versuchen Nr. 75 und 76 als Optimalpunkt angenommen
97,5 „ Wasser }
350 ccm insgesamt.

Durch die Lösung wurde über Nacht Wasserstoff geleitet.

Vor der Koagulation $p_H = 4{,}66$
Nach „ „ $p_H = 5{,}25$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 326 mg N
50 „ des Filtrats „ 10,8 „ „
(= 3,31 % des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

250 ccm Serum
106 „ 0,2 n-Essigsäure } Die Mitte zwischen den Versuchen Nr. 80 und 81 als Optimalpunkt angenommen
81 „ Wasser }
437 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_H = 4{,}68$
Nach „ „ $p_H = 4{,}80$
50 ccm der Hauptlösung enthielten 284 mg N
50 „ des Filtrats „ 8,6 „ „
(= 3,03 % des Gesamtstickstoffs).

e) In der Tabelle X sind die Ergebnisse sämtlicher in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche eingetragen worden.

Man ersieht aus den im dritten Stab der Tabelle aufgeführten Werten von p_H, daß die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration einigermaßen konstant ist und wesentlich größer als diejenige Wasserstoffionenkonzentration, die nach den Untersuchungen von L. Michaelis, P. Rona und P. Mostynski (S. 398) dem isoelektrischen Punkt des Serumalbumins entspricht. Dieselbe wird nämlich in der letzten Arbeit von L. Michaelis und P. Rona[1]) gleich $0{,}3 \cdot 10^{-5}$, $p_H = 5{,}52$ entsprechend, angegeben (siehe übrigens S. 432).

Wie schon in der Einleitung (siehe S. 398) erwähnt, variiert der Wert des p_H ein wenig mit der Konzentration der Proteinlösung, indem p_H desto größer ist, je schwächer die betreffende Proteinlösung ist; besonders aufklärend in dieser Beziehung sind die drei Versuche, die mit derselben Eiweißlösung, aber in verschiedener Verdünnung, ausgeführt sind. Außerdem ist der optimale Wert des p_H für die dialysierten, salzarmen Lösungen durchgehends etwas größer gefunden als für die nicht dialysierten, salzreichen; doch ist der Unterschied nicht größer, als daß er sich durch den kleinen Proteingehalt der dialysierten Lösungen erklären läßt. Zieht man indessen auch noch die im Schluß des vorigen Abschnitts (siehe S. 407) erwähnten Versuche mit in Betracht, so kann es wohl keinem Zweifel unterliegen, daß ein Zusatz von Salz die für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration ein wenig gegen die saure Seite hin verschiebt, so daß p_H für salzreiche Lösungen niedriger als für salzarme gefunden wird.

Die hier erwähnten Abweichungen der gefundenen Optimalwerte des p_H untereinander sind zwar nur klein, rühren aber doch sicherlich nicht von Versuchsfehlern her. Man muß sich immerhin erinnern, daß die Messung der Wasserstoffionenkonzentration bei 18° vorgenommen, während die Koagulation bei 100° ausgeführt wurde. Da die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration durch Erhöhung der Temperatur von 18° auf 100° höchstwahrscheinlich sowohl von der Konzentration der Proteinlösung als auch vom Salzgehalt der Lösung abhängig ist, so haben wir hier eine Fehlerquelle, über deren Bedeutung die von uns gemachten Versuche keine Auskunft geben. Wir sind aber doch der

[1]) Diese Zeitschr. 27, 38, 1910.

Tabelle

Übersicht über die Änderung der Wasserstoff-

Die angewandte Proteinlösung	Die angewandte Säure	Die Wasserstoffionenkonzentration vor der Koagulation p_H	Die Wasserstoffionenkonzentration nach der Koagulation p_H
Eiereiweißlösung (nicht dialysiert)	Salzsäure	4,60	5,21
„ („ „)	„	4,69	5,36
„ („ „)	„	4,65	5,32
„ („ „)	„	4,72	5,41
„ („ „)	„	4,94	6,31
„ (dialysiert)	„	4,82	5,45
„ (nicht dialysiert)	Schwefelsäure	4,68	5,51
„ (dialysiert)	„	4,71	5,25
„ (nicht dialysiert)	Milchsäure	4,69	4,92
„ („ „)	Essigsäure	4,69	4,76
„ (dialysiert)	„	4,73	4,78
Pferdeblutserum (rötlich, nicht dialysiert) . .	Salzsäure	4,66	5,25
„ (gelb, „ „) . .	Essigsäure	4,68	4,80

Ansicht, daß die genannten Variationen im Optimalwerte des p_H nicht einer Fehlerquelle der Methode zuzuschreiben sind, sondern, wie es im folgenden des näheren erwähnt werden wird, vielmehr im wesentlichen auf die Konzentration der Proteinlösung zurückzuführen sind (siehe S. 428).

Was den Gesamtstickstoff im Filtrat nach der Koagulation anlangt, so hängt die absolute Menge natürlich vom Gesamtstickstoff vor der Koagulation ab, das Verhältnis zwischen den beiden ist aber in allen Versuchen mit Eiereiweiß (Koagulationsdauer: $^1/_2$ Stunde) einigermassen dasselbe, indem nämlich ersterer 7 bis 8% vom letzteren beträgt (Tabelle X, vorletzter Stab). Nur in denjenigen Versuchen, in denen mit Schwefelsäure angesäuert wurde oder die Proteinkonzentration ganz klein ist, ist die prozentische Menge nicht auskoagulierter Stickstoffverbindungen ein wenig größer gefunden worden. Die dialysierten Lösungen haben immer einen kleineren Stickstoffgehalt im Filtrate gegeben als die nicht dialysierten; das rührt zweifellos nur zum Teil davon her, daß nicht koagulable Stickstoffkörper wegdialysiert sind, eher aber davon (man vergleiche die Versuche S. 407), daß die Koagulation in salzreichen Lösungen weniger vollständig oder jedenfalls weniger schnell verläuft als in salzarmen.

X.

ionenkonzentration während der Koagulation.

Milligramm Stickstoff in 50 ccm der Lösung vor der Koagulat. a	des Filtrats nach der Koagulat. b	b in % von a ausgedrückt	Bemerkung
249,0	19,75	7,93	Wasserstoffdurchleitung nach Zugabe überschüssiger Säure
189,0	14,10	7,46	„ „ „ d. optimal. Säuremenge
186,0	14,38	7,73	do. (diese 3 Lösungen wurden aus derselben Eiweißlösung hergestellt)
93,2	7,98	8,56	
37,3	3,98	10,67	
126,0	9,27	7,36	Wasserstoffdurchleitung nach Zugabe d. optimal. Säuremenge
244,0	23,90	9,80	„ „ „ überschüssiger Säure
142,0	11,45	8,06	„ „ „ d. optimal. Säuremenge
210,0	15,30	7,29	„ „ „ überschüssiger Säure
199,0	15,90	7,99	„ „ „ „ „ „
135,0	9,46	7,01	„ „ „ d. optimal. Säuremenge
326,0	10,80	3,31	„ „ „ „ „ „
284,0	8,60	3,03	„ „ „ „ „ „

Im Serum ist die Menge der nicht koagulablen oder nicht koagulierten Stickstoffverbindungen geringer als im Eiereiweiß.

Was endlich die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation betrifft, so zeigt ein Vergleich des p_H· im dritten und vierten Stab der Tabelle, daß dieselbe in denjenigen Versuchen, in denen mittels der starken Säuren, Salzsäure oder Schwefelsäure, angesäuert wurde, weit größer ist als in den Versuchen mit Milchsäure oder Essigsäure.

Wir haben eine Erklärung dieses sonderbaren Verhaltens durch die Annahme versucht, daß bei der Koagulation nicht reines Protein, sondern ein Salz des Proteins mit der angewandten Säure ausgeschieden wird. Wenn diese Annahme richtig wäre, dann wäre natürlich zu erwarten, daß der Umfang dieser Salzbildung desto größer sein würde, je stärker die jeweilige Säure ist. Aus dem unten beschriebenen Versuch, in dem mit Salzsäure angesäuert wurde, ersieht man indessen, daß wir die Richtigkeit dieser Annahme nicht experimentell haben beweisen können; im Gegenteil, der Versuch zeigt, daß einer dialysierten,

salzarmen, mit der optimalen Menge Salzsäure angesäuerten Lösung von Eiereiweiß meßbare Mengen von Salzsäure durch die Koagulation nicht entzogen werden. Durch die Koagulation wird demnach — in guter Übereinstimmung mit den von Michaelis, Rona und Mostynski entwickelten Anschauungen — nur das Protein selbst ausgeschieden.

Für den Versuch wurde eine durch langdauernde Dialyse gereinigte Eiereiweißlösung angewandt, die in 50 ccm 372 mg Stickstoff enthielt. Die für die Koagulation optimale Salzsäuremenge wurde wie gewöhnlich ermittelt, und danach wurde der Hauptlösung die folgende Zusammensetzung gegeben:

300 ccm dialysierter Eiweißlösung,
30,5 „ 0,1 n-Salzsäure,
89,5 „ Wasser,
420 ccm insgesamt.

Die Lösung wurde in einem mit Rückflußkühler versehenen Kolben von Jenaglas durch Erhitzen in siedendem Wasser koaguliert. Es wurde 1 Stunde erwärmt, um eine große Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten, und damit übereinstimmend wurde gefunden:

vor der Koagulation $p_H = 4{,}79$,
nach „ „ $p_H = 6{,}02$.

100 ccm des nach Stehenlassen und Filtrierung erhaltenen Filtrats wurden mit 5 ccm 0,4 n-Barytlösung versetzt und die alkalische Flüssigkeit in einer Platinschale zur Trockne eingedampft. Der organische Verdampfungsrückstand wurde bei einer möglichst niedrigen Temperatur geglüht und der Glührückstand mit Wasser ausgelaugt. Die Chlormenge der erhaltenen Lösung wurde nach Volhard titrimetrisch ermittelt. Wir fanden in dieser Weise in 100 ccm Filtrat eine Chlormenge, die

a) 7,19 ccm 0,1 n-Salzsäure,
b) 7,20 „ 0,1 „

entsprach, während die berechnete Menge

$$\frac{30{,}5 \times 100}{420} = 7{,}26 \text{ ccm } 0{,}1 \text{ n-Salzsäure}$$

ist (ohne Rücksicht auf das Volum des Gerinnsels).

Ein Kontrollversuch wurde gemacht, indem eine Mischung von

30,5 ccm 0,1 n-Salzsäure und
389,5 „ Wasser
420 ccm insgesamt

in einem Jenakolben während 1 Stunde, wie oben erwähnt, erhitzt wurde, wonach 100 ccm der Mischung mit 5 ccm 0,4 n-Bariumhydroxydlösung eingedampft und der Rückstand über derselben Gasflamme und ebenso

lange Zeit wie im Hauptversuch geglüht wurde. Im Glührückstand fanden wir eine Chlormenge, die

a) 7,20 ccm 0,1 n-Salzsäure,
b) 7,22 „ 0,1 „

entsprach, somit dieselbe Menge wie in 100 ccm des Filtrats.

Wir müssen darauf aufmerksam machen, daß es nicht möglich ist, den Chlorgehalt des Filtrats genau nach Volhard ohne vorhergehendes Wegglühen des organischen Stoffes zu ermitteln, indem ein Teil des Silberchlorids, selbst auch bei Fällung in ziemlich stark salpetersaurer Flüssigkeit, in kolloidalem Zustand in Lösung bleibt. Aus demselben Grund darf man sich nicht darauf verlassen, daß eine Proteinlösung absolut chlorfrei ist, auch wenn sie, mit Salpetersäre angesäuert, mit Silbernitrat keine Trübung gibt. Endlich muß man sich vergegenwärtigen, daß das Wegglühen der stickstoffhaltigen Kohle in Gegenwart von Bariumhydroxyd möglicherweise zur Bildung von Cyaniden Anlaß geben kann.

Es wurden deshalb 50 ccm der ursprünglichen, zur Herstellung der Hauptlösung benutzten Eiweißlösung, die sich bei der gewöhnlichen Probe mittels Salpetersäure und Silbernitrat als völlig chlorfrei erwiesen hatten, mit 5 ccm 0,4 n-Bariumhydroxydlösung eingedampft, und der Rückstand wurde auf dieselbe Weise, in derselben Schale und über derselben Gasflamme geglüht, die beim Hauptversuche benutzt worden waren und weiter behandelt. Der wässerige Auszug des Glührückstands gab mit Salpetersäure und Silbernitrat eine schwache, aber deutliche Trübung. Ob diese von Cyanid oder von Chlorid herrührte, konnte nicht ermittelt werden; die Menge war aber jedenfalls so geringfügig, daß eine so geringe Cyanidbildung oder ein so niedriger Chlorgehalt keinen Einfluß auf die Beweiskraft der oben erwähnten Versuche ausüben kann.

In der schon in der Einleitung erwähnten Abhandlung[1]) betonen Michaelis und Rona zu wiederholten Malen stark, daß eine Abgabe von Kohlensäure während der Koagulation eine Reaktionsänderung in alkalischer Richtung bewirken werde. Auch wir haben selbstverständlich diesen Umstand mit in Betracht gezogen, weshalb wir mit Lösungen gearbeitet haben, die nach langdauernder Wasserstoffdurchleitung durch die saure Flüssigkeit als kohlensäurefrei angesehen werden mußten. Jedenfalls sind wir der Ansicht, daß die von uns wahrgenommene Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation sich nicht in dieser Weise erklären läßt. Wenn das der Fall wäre, stände es nämlich zu erwarten, daß die ausgetriebene Kohlensäure zwar von der Größe der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist, nicht aber von der Natur der zum Ansäuern angewandten Säure.

[1]) Diese Zeitschr. 18, 336, 1909.

Auch müssen wir es als völlig ausgeschlossen betrachten, daß die benutzten, dialysierten Eiweißlösungen solche Mengen von Kohlensäure oder Carbonaten hätten enthalten können, daß dieselbe in dieser Beziehung irgend eine Rolle zu spielen imstande wäre. Sollte von einer Entweichung von Kohlensäure die Rede sein können, dann müßte diese deshalb gewiß von einer Spaltung des Proteinmoleküls während der Koagulation herrühren, indem man sich wohl vorstellen könnte, daß die Kohlensäure in ähnlicher Weise wie in den von M. Siegfried untersuchten Carbaminoverbindungen[1]) im Proteinmolekül gebunden ist; auch diese Auffassung wird aber durch einige zur Erläuterung der Frage angestellten Versuche nicht gestützt. Es hat sich nämlich bei diesen unten beschriebenen, von Herrn S. Palitzsch ausgeführten Versuchen ergeben, daß überhaupt keine meßbaren Mengen von Kohlensäure durch die Koagulation entwickelt werden. Die Versuche wurden solcherweise angestellt, daß die beim Koagulieren eventuell entwickelte Kohlensäure in einer Bariumhydroxydlösung aufgefangen werden konnte.

Der erste Versuch wurde angestellt mit einer Mischung von 700 ccm in üblicher Weise dargestellter, etwa 4%iger genuiner Eiweißlösung, die nicht durch Dialyse von Salzen befreit worden war, und 20 ccm 1 n-Salzsäure. Das Gemisch wurde mittels Durchströmung von Wasserstoff über Nacht von Kohlensäure befreit und zeigte dann bei elektrometrischer Messung eine Wasserstoffionenkonzentration entsprechend $p_{H\cdot} = 3{,}87$.

Die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration wurde in gewöhnlicher Weise ermittelt und danach die Hauptlösung zubereitet durch Vermischen von

500 ccm der sauren, kohlensäurefreien Eiweißlösung,
42 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung,
18 „ Wasser.

Diese Mischung gab bei elektrometrischer Messung $p_{H\cdot} = 4{,}70$.

Die Koagulation wurde in einem 1-l-Kolben ausgeführt. Der Kolben war mit einem zum Boden reichenden Zuleitungsrohr und einem Rückflußkühler versehen. Der Rückflußkühler seinerseits war mit einer Reihe Absorptionsflaschen mit bariumchloridhaltiger Bariumhydroxydlösung verbunden. Der ganze Apparat wurde vor Anfang des Versuchs mit kohlensäurefreier Luft gefüllt, worauf die klare Bariumhydroxydlösung in die Absorptionsflaschen gebracht und endlich 300 ccm der oben erwähnten Lösung ($p_{H\cdot} = 4{,}70$) in den Kolben gegossen wurden.

Nun wurde kohlensäurefreie Luft durch die Flüssigkeit und den ganzen Apparat während $1^1/_2$ Stunden geleitet, ohne daß die Bariumhydroxyd-

[1]) Ergebnisse der Physiologie 9, 334, 1910.

lösung dadurch getrübt wurde. Danach wurde der Kolben mit der Lösung in siedendem Wasser unter wiederholtem tüchtigem Umschütteln und steter langsamer Durchleitung kohlensäurefreier Luft während 1 Stunde erhitzt, wonach gekühlt und die Durchströmung kohlensäurefreier Luft noch 2 Stunden fortgesetzt wurde. Dadurch wurde die Bariumhydroxydlösung in der ersten Absorptionsflasche ganz schwach aber deutlich getrübt.

Um den Kohlensäurewert dieser Trübung zu ermitteln, wurde ein wenig Phenolphthalein und dann vorsichtig 0,1 n-Salzsäure, bis die rote Farbe noch eben wahrnehmbar war, zugegeben. In der auf diese Weise erhaltenen Aufschwemmung von Bariumcarbonat in einer Bariumchloridlösung wurde der Carbonatgehalt durch Zugabe von 5 ccm 0,2 n-Salzsäure, Wegkochen der Kohlensäure, Abkühlung und Rücktitrieren mit 0,2 n-Natriumhydroxydlösung bestimmt. Es wurden von der letzteren 4,80 ccm verbraucht. Die beim Koagulieren entwickelte Kohlensäuremenge entspricht somit höchstens 5,00 — 4,80 = 0,2 ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung.

Ein ganz ähnliches Resultat wurde erreicht in Versuchen, bei denen die Eiweißlösung mit Milchsäure oder Essigsäure angesäuert wurde, und endlich ergab ein Kontrollversuch, bei dem ausgekochtes Wasser statt der Eiweißlösung benutzt wurde, eine Kohlensäureentwicklung von ganz derselben Größenordnung. Man darf hieraus den Schluß ziehen, daß die bei den Versuchen mit Eiweißlösungen ausgeschiedenen, ganz kleinen Bariumcarbonatmengen nicht oder nur in unwesentlichem Maße von während der Koagulation entwickelter Kohlensäure herstammen, sondern dagegen vielmehr auf Fehlerquellen bei der Versuchsanordnung, und dann natürlich besonders auf Zufuhr atmosphärischer Kohlensäure zurückzuführen sind.

Der Kolben mit dem Gerinnsel stand über Nacht im Eisschranke, wonach das bei der Koagulation verdampfte Wasser — durch Wägung des Kolbens vor und nach dem Erhitzen ermittelt — zugesetzt wurde (die Menge variierte von 0,25 bis 0,4 g). Nach gutem Schütteln wurde filtriert und die Wasserstoffionenkonzentration im Filtrat elektrometrisch gemessen. Ebenso wurde der Gesamtstickstoff der Lösung vor und nach der Koagulation bestimmt. Die gefundenen Werte, die in der Tab. XI zusammengestellt sind, zeigen, daß die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration bei den Koagulationen sowie auch die Stickstoffgehalte der Filtrate ganz den bei den früher beschriebenen Versuchen obwaltenden Verhältnissen entsprechen.

Ein nicht fernliegender Gedanke ist es, daß die hier untersuchte Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation möglicherweise ihren Grund hat in der im folgenden Abschnitt besprochenen Dekomposition, der eine Proteinlösung durch zu lange dauerndes Erhitzen unterliegt. Es wäre des-

halb auch die Annahme nicht unbedingt zu verwerfen, daß auch selbst bei optimalen Koagulationsbedingungen und Anwendung der optimalen Koagulationsdauer eine geringfügige Spaltung eintreten und zu Reaktionsänderungen Anlaß geben könnte. Wenn dieser Umstand aber die Abhängigkeit der Reaktionsverschiebung von der Natur der anwesenden Säure erklären sollte, dann wäre man zu der Annahme gezwungen, daß auch die Art und der Umfang der Spaltung davon abhängig wäre und nicht nur von der Größe der Wasserstoffionenkonzentration, was uns wenig wahrscheinlich vorkommt. Es hat sich denn auch bei einigen unten beschriebenen Versuchen, wo wir unter anderen den Umfang der Proteinspaltung während der Koagulation durch Formoltitrierung[1]) in dem vom Gerinnsel abfiltrierten verfolgten, herausgestellt, daß die Spaltung erstens äußerst geringfügig ist, selbst wenn 1 Stunde in siedendem Wasser erhitzt wird, und zweitens daß sie ganz unabhängig von der Art und Natur der angewandten Säure ist.

Tabelle XI.

Die beim Versuch benutzte Lösung	Die beim Versuch gefundene Menge Bariumcarbonat x ccm 0,2 n-Salzsäure entsprechend x	Wasserstoffionenkonzentration		mg Gesamtstickstoff in 50 ccm		b in % von a ausgedrückt
		vor der Koagulation p_H	nach der Koagulation p_H	Lösung vor der Koagulation a	Filtrat nach der Koagulation b	
Eiweißlösung mit Salzsäure angesäuert . .	0,20	4,70	6,01	241,9	17,80	7,36
Eiweißlösung mit Milchsäure angesäuert . .	0,25	4,69	4,94	218,0	17,00	7,80
Eiweißlösung mit Essigsäure angesäuert . .	0,18	4,68	4,74	221,0	16,88	7,64
Destill. Wasser .	0,20	—	—	—	—	—

Es wurden 3 Koagulationsversuche ausgeführt mit derselben Eiweißlösung als Ausgangsmaterial und mit Salzsäure, bzw. Milchsäure oder Essigsäure angesäuert. Die Versuche wurden ganz wie oben (siehe S. 408) beschrieben ausgeführt, indem man, um der vollständigen Austreibung der Kohlensäure sicher zu sein, einen Überschuß der Säure hinzufügte, dann über Nacht einen Wasserstoffstrom durchleitete, wonach es durch

[1]) Diese Zeitschr. 7, 45, 1907.

Vorversuche ermittelt wurde, wieviel Natriumhydroxyd zugefügt werden mußte, um die optimalen Koagulationsverhältnisse zu erreichen, bei denen die Hauptversuche ausgeführt sein sollten. Die Koagulationsdauer war 1 Stunde. Außer den gewöhnlichen Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration und des Stickstoffgehalts sowohl in der nicht koagulierten Lösung als auch im Filtrat vom Gerinnsel, wurde bei diesen Versuchen zugleich diejenige Menge 0,2 n-Natriumhydroxydlösung ermittelt, die 30 ccm der nicht koagulierten Lösung bzw. des Filtrats verlangten,

1. um gegen empfindliches Lackmuspapier[1]) neutral zu werden und 2. um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden.

Endlich wurde bestimmt:

3. die Menge formoltitrierbaren Stickstoffs, indem man mit Phenolphthalein bis zu stark roter Farbe titrierte, und die Lackmusneutralität als Ausgangspunkt der Berechnung nahm. Die Gegenwart der schwachen Säure, Essigsäure, in dem einen Versuch, wird unter diesen Umständen bewirken, daß die Formoltitrierungen bei diesem Versuche etwas zu hohe Resultate[2]) geben.

Die Resultate sind in der Tabelle XII eingetragen.

Tabelle XII.

Angesäuert mit	30 ccm der nicht koagulierten Lösung						30 ccm des Filtrats					Wasserstoffionenkonzentration	
	enthielten a ccm 0,2 n-Säure der zugesetzten Säure	verlangten, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden, b ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	verlangten, um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden, in allem c ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	enthielten d Milligramme Gesamtstickstoff	enthielten e Milligramme formoltitrierbaren Stickstoff	e in % von d ausgedrückt	verlangten, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden, f ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	verlangten, um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden, g ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	enthielten h Milligramme Gesamtstickstoff	enthielten i Milligramme formoltitrierbaren Stickstoff	i in % von h ausgedrückt	Vor der Koagulation	Nach der Koagulation
	a	b	c	d	e		f	g	h	i		p_H	p_H
Salzsäure	2,60	1,42	1,60	140,9	6,50	4,61	0,10	0,12	10,49	0,39	3,72	4,68	5,71
Milchsäure	2,76	1,59	1,80	130,8	6,30	4,82	0,39	0,41	10,20	0,45	4,41	4,69	4,94
Essigsäure	6,88	5,56	5,92	132,6	6,72	5,07	4,10	4,22	10,13	0,42	4,15	4,68	4,74

Aus Tabelle XII, Stab 6 und 7 ersieht man, daß die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs, wie es natürlich zu erwarten war, in allen

[1]) Dargestellt nach V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 133, 1909.

[2]) Vgl. V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 33, 1909.

drei nicht koagulierten Lösungen dieselbe ist — daß das Resultat im Versuch mit Essigsäure ein bißchen zu hoch ausfällt, ist schon oben bemerkt worden —, und in den Stäben 11 und 12 sieht man, daß dasselbe auch in betreff der Filtrate der Fall ist. Die Zahlen sind im letzteren Falle so klein, daß ihre gute gegenseitige Übereinstimmung untereinander als ein Zufall angesehen werden muß; der Einfluß der Essigsäure im dritten Versuch ist unmerklich.

Warum die Reaktionsänderung in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der angewandten Säure steht, darüber gestatten unsere Experimente nicht, uns eine sichere Auffassung zu bilden; wir meinen aber, daß die Sache in allem wesentlichen als ein Verdünnungsphänomen zu betrachten ist, eine Meinung, die durch die in der Tabelle XII aufgeführten Zahlen eine Stütze findet, und die übrigens auch eine Erklärung von einigen der früher erwähnten Verhältnisse gibt.

In der Tabelle XII, Stab 2 sind die Mengen der beim Ansäuern angewandten Säure aufgeführt, Zahlen, die aus den bei der Zubereitung der Hauptlösung benutzten Mengen Eiweißlösung, Säure, Natriumhydroxydlösung und Wasser leicht zu berechnen sind. Betrachtet man jetzt den Versuch mit Salzsäure, so findet man dort in 30 ccm Lösung in allem 2,60 ccm — durch zugefügtes Natriumhydroxyd nicht neutralisierte — Salzsäure (Stab 2), es sind aber, um eine schwach rote Farbe mit Phenolphthalein hervorzurufen, 1,60 ccm 0,2 n-Natriumhydroxyd nötig (Stab 4). Man könnte dadurch versucht sein, zu glauben, daß $(2{,}60 - 1{,}60) = 1{,}00$ ccm Salzsäure zur Neutralisation der in der Eiweißlösung gegenwärtigen, basisch reagierenden Salze, z. B. Carbonaten, verbraucht waren, während 1,60 ccm Salzsäure an das Protein gebunden waren, und von dieser Kombination von Salzsäure und Protein müßte dann die saure Reaktion der Lösung ($p_H = 4{,}68$) herrühren. So kann aber die Sache nicht liegen; denn durch die Koagulation wird, wie wir es durch die oben beschriebenen Versuche dargetan haben, nur Protein, aber keine Salzsäure, ausgefällt, weshalb letztere im Filtrate wiedergefunden werden müßte. Das Filtrat müßte dann wahrscheinlich eine stärker saure Reaktion besitzen als die nicht koagulierte Lösung, während der Versuch hingegen zeigt, daß das Gegenteil der Fall ist. Ebenfalls müßte das Filtrat, um mit Phenolphthalein eine schwach rote Farbe zu erhalten, einen reichlichen Zusatz von Natriumhydroxyd ver-

langen; der Versuch zeigt aber nur einen Verbrauch von 0,12 ccm Natriumhydroxydlösung (Tabelle XII, Stab 9).

Die erhaltenen Resultate werden indessen leicht verständlich, wenn man annimmt, daß die ganze — oder beinahe die ganze — Salzsäuremenge zur Neutralisation der in der Eiweißlösung anwesenden, alkalisch reagierenden Salze gebraucht worden ist, und daß die saure Reaktion der Lösung, jedenfalls der Hauptsache nach, von dem sauren Charakter des reinen Proteins herrührt. Bekanntlich sind sowohl die Proteine als auch deren Spaltungsprodukte von amphoterer Natur; bei Zusatz von Säuren wirken sie als Basen, bei Zusatz von Basen dagegen als Säuren. Eine wässerige Lösung eines reinen Proteins wird je nach dem angewandten Protein einen etwas verschiedenen Charakter haben. Was die früher als neutral angesehenen Proteine anbelangt, so muß man sagen, daß, wenn auch die Anzahl der basischen Gruppen der der sauren Gruppen entspricht, so sind die Dissoziationskonstanten der letzteren weit größer als die der basischen Gruppen, infolgedessen wirken solche Proteine wie Eieralbumin und Serumalbumin im großen und ganzen wie schwache Säuren.

Es ist nichts Auffallendes, daß Lösungen solcher schwachen Säuren, die schwach basische Gruppen enthalten, bedeutende Basenmengen verlangen, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden (1,42 ccm, Stab 3), und ebensowenig Auffallendes hat es, daß noch mehr von der Base erforderlich ist, ehe die rote Farbe des Phenolphthaleins auftritt (1,60 ccm, Stab 4). Ganz analoge Verhältnisse sind bei den Aminosäuren, bei den Peptonen und ganz besonders bei dem einzigen in dieser Beziehung untersuchten Polypeptid, dem Glycylglycin[1]), bekannt.

Weil nun durch die Koagulation der allergrößte Teil des Proteins, das heißt der schwachen Säure, die die Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen bedingt, ausgefällt wird, so ist es natürlich, daß diese letztere Konzentration mit dem Stickstoffgehalt gleichzeitig, wenn auch nicht proportional, vermindert wird. In dem in der Tabelle XII aufgeführten Versuch mit Salzsäure findet sich im Filtrate nur $^1/_{13}$ bis $^1/_{14}$ der

[1]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 31, 1909.

ursprünglichen Stickstoffmenge, während die Wasserstoffionenkonzentration desselben etwa 10 mal kleiner ist als in der nicht koagulierten Lösung ($p_{H\cdot} = 5{,}71$ bzw. 4,68).

Wir sind uns wohl bewußt, daß eine Eiweißlösung wie diejenige, mit der wir gearbeitet haben, ein Gemisch von mehreren Proteinen enthält und daß die Hauptmenge der nicht koagulablen Stickstoffkörper von ganz anderer Natur (Mucoiden) ist als das koagulable Protein. Was die oben erwähnten Betrachtungen anbelangt, hat das aber kaum etwas zu bedeuten, da sämtliche gegenwärtige Proteine in den hier besprochenen Beziehungen sich ganz in derselben Weise zu verhalten scheinen. Die Abnahme des Stickstoffgehalts während der Koagulation wird von einer ganz entsprechenden Abnahme des Gehalts an formoltitrierbarem Stickstoff und des Verbrauchs an Natronlauge zur Erreichung der Lackmusneutralität und der roten Farbe mit Phenolphthalein begleitet.

Wenden wir uns jetzt zu dem Versuch mit Essigsäure, dann sehen wir, daß von der zugegebenen Essigsäuremenge (6,88 ccm, Tabelle XII, Stab 2) eine mit der Salzsäuremenge (2,60 ccm) äquivalente Menge verbraucht wird, um mit den anwesenden Carbonaten normale Acetate zu bilden. Es restieren dann $(6{,}88 - 2{,}60) = 4{,}28$ ccm 0,2 n-Essigsäure, die nach der Koagulation beim Titrieren des Filtrats bis auf schwach rote Farbe mit Phenolphthalein wiedergefunden werden (gefunden: 4,22 ccm, Stab 9; beim Titrieren solcher schwachen Säuren wie Essigsäure bis zur neutralen Reaktion gegen Lackmuspapier bekommt man, wie bekannt, aus leichtverständlichen Gründen zu niedrige Resultate). In derselben Weise wird die nicht koagulierte Lösung, um mit Phenolphthalein rot zu werden, die mit der überschüssigen Essigsäure äquivalente (4,28 ccm) plus die der Reaktionsänderung des Proteins entsprechende (1,60 ccm) (s. S. 429) Menge Natriumhydroxydlösung, zusammen 5,88 ccm, verlangen (gefunden: 5,92 ccm, Stab 4).

Weiter ist es leicht verständlich, daß es, um der Proteinlösung eine $p_{H\cdot} = 4{,}68$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration beizubringen, notwendig ist, mehr Essigsäure als Salzsäure hinzusetzen. Während nämlich die gebildeten Chloride neutral reagieren und deshalb nur eine ganz kleine Spur eines Salzsäureüberschusses verlangen, um im Verein mit dem schwach sauren Protein die des öfteren erwähnte optimale Wasserstoffionenkonzentration in der betreffenden Lösung hervorzurufen, so reagieren die gebildeten Acetate, dank der hydrolytischen

Spaltung, stark alkalisch, dermaßen, daß erst ein Gemisch von Acetat und reichlicher Essigsäure zusammen mit dem Proteine die gewünschte optimale Wasserstoffionenkonzentration gibt. Dieses Gemisch von Acetat und Essigsäure wirkt nun bei der Koagulation wie ein „Puffer“[1]), und zwar so, daß die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration wegen des Auskoagulierens des Proteins nur ganz wenig merkbar wird.

Betreffs des Versuchs mit Milchsäure lassen sich ganz ähnliche Betrachtungen und Berechnungen geltend machen; die Milchsäure ist aber eine weit stärkere Säure als die Essigsäure, weshalb der notwendige Überschuß an jener auch nur sehr klein ist (2,76 — 2,60 = 0,16 ccm). Das Gemisch von Lactat und Milchsäure wirkt somit nur in kleinerem Maße als Puffer bei der Koagulation, bei der, wenn auch weit weniger scharf ausgesprochen als bei der Salzsäure, eine deutliche Reaktionsänderung in alkalischer Richtung stattfindet.

Betrachtet man somit die Wasserstoffionenkonzentrationsänderung bei der Koagulation als von einer Konzentrationsabnahme des Proteingehalts herrührend, so versteht man leicht den im vorhergehenden (siehe Tabelle X und S. 419) angedeuteten Zusammenhang zwischen der für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration und der Proteinkonzentration. Erinnert man sich nämlich, daß nur das Protein selbst, nicht aber ein Salz desselben auskoaguliert, dann muß man wahrscheinlich erwarten, daß die günstigsten Koagulationsbedingungen des amphoteren Proteins dann vorhanden sein werden, wenn weder an Säure noch an Base ein Überschuß vorhanden ist, mit dem das Protein ein Salz bilden könnte. Handelt es sich nun, wie bei allen hier beschriebenen Versuchen, wo mit Salzsäure angesäuert wurde, nur um starke Säuren oder Basen, dann wird folglich unter optimalen Koagulationsbedingungen die Lösung nur neutrale Salze nebst einem oder mehreren Proteinkörpern enthalten, und es wird demgemäß die Konzentration der letzteren für die Wasserstoffionenkonzentration maßgebend sein. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration wird somit desto größer — das entsprechende

[1]) Diese Zeitschr. 21, 187, 1909.

p_H demzufolge desto kleiner — sein, je größer die Konzentration der vorliegenden Proteinlösung ist.

Wie schon früher (S. 419) hervorgehoben worden ist, finden Michaelis und Rona, daß „der isoelektrische Punkt" des Serumalbumins bei etwa $0{,}3 \times 10^{-5}$ (dem $p_H = 5{,}52$ entsprechend), d. h. bei einer bedeutend niedrigeren Wasserstoffionenkonzentration als der von uns für die Koagulation gefundenen Optimalkonzentration, liegt. Vielleicht findet dieses Verhältnis seine Erklärung dadurch, daß Michaelis und Rona gewöhnlich mit denaturierten Proteinen gearbeitet und immer, soweit es aus ihren Angaben ersichtlich ist, weit schwächere Proteinlösungen oder Aufschwemmungen angewendet haben, als die bei unseren Versuchen benutzten.

Es ist ebenfalls im vorhergehenden (S. 419) darauf aufmerksam gemacht worden, daß ein Salzzusatz die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration ein wenig gegen die saure Seite hin zu verschieben scheint; vielleicht findet man, den obigen Anführungen gemäß, die Erklärung in der von Arrhenius[1]) gefundenen Tatsache, daß die Gegenwart von Neutralsalzen die Dissoziationskonstante schwacher Säuren — in diesem Falle die Konstante des als Säure wirkenden Proteinstoffes — erhöht.

Vollständigkeitshalber und um Mißverständnissen vorzubauen mögen noch ein paar Bemerkungen hinzugefügt werden.

Wenn die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration mit der einer wässerigen Lösung des reinen Proteins zusammenfällt, dann darf man erwarten, daß durch Dialyse gereinigte, salzfreie Proteinlösungen keinen Säurezusatz verlangen werden, um optimale Koagulationsbedingungen zu geben. Bei den früher beschriebenen Versuchen mit durch Dialyse gereinigten Eiereiweißlösungen haben wir indessen eine gar nicht unbedeutende Säuremenge zugeben müssen, um optimale Koagulationsverhältnisse zu erzielen. Die Ursache davon ist gewiß darin zu suchen, daß die von uns benutzten Eiweißlösungen noch nicht rein gewesen sind, indem, wie W. Pauli und R. Wagner[2]) neuerdings bemerkt haben, die Anionen sich viel leichter als die Kationen aus einer salzhaltigen Eiweißlösung

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 31, 197, 1899.

[2]) Diese Zeitschr. 27, 300, 1910.

durch Dialyse entfernen lassen, und zwar, weil der basische Charakter der Proteine viel weniger ausgesprochen als der saure ist. Wir haben demnach wahrscheinlich mit Eiweißlösungen gearbeitet, die von basischen Stoffen noch nicht befreit waren, und solche Lösungen verlangen selbstverständlich einen angemessenen Säurezusatz, um die Optimalwasserstoffionenkonzentration zu erreichen.

Auch müssen wir noch einem im vorhergehenden erwähnten Verhältnisse (s. S. 417) ein wenig weitere Aufmerksamkeit widmen. Es hat sich bei 3 Versuchsreihen mit Eiereiweiß von verschiedenem Verdünnungsgrad herausgestellt, daß die optimale Salzsäuremenge nicht der angewandten Menge Eiweißlösung ganz proportional war — was man ja erwarten mußte, wenn die einzige Aufgabe der Salzsäure die war, die in der Eiweißlösung anwesenden Carbonate zu neutralisieren —, sondern ein wenig stärker zunahm als die Proteinkonzentration. Dieses könnte darauf hindeuten, daß die Optimalwasserstoffionenkonzentration nicht ausschließlich durch den dem Proteine eigenen sauren Charakter bedingt ist, sondern daß auch noch ein — vielleicht ganz außerordentlich kleiner — Überschuß an Salzsäure notwendig ist. Die erwähnte Tatsache läßt sich indessen auch anders erklären, indem ein Gehalt an schwachen Säuren sich eben in dieser Weise bemerkbar machen würde, und eine durch Dialyse nicht gereinigte Eiweißlösung enthält ja z. B. Phosphate.

Immerhin betrachten wir aber nicht die hier erörterte Frage als eine endgültig erledigte, und wir haben uns deshalb im vorhergehenden immer auch mit einigem Vorbehalt ausgedrückt, indem wir aus unseren Versuchen nur die folgenden Schlüsse gezogen haben:

1. Es ist anzunehmen, daß die für die Koagulation einer reinen Proteinlösung optimale Wasserstoffionenkonzentration im wesentlichen diejenige ist, die der saure Charakter des Proteins der Lösung verleiht, oder anders gesagt, die optimale Wasserstoffionenkonzentration ist im wesentlichen nichts anderes als diejenige, die eine Lösung von reinem Proteinstoff in reinem Wasser als Folge der elektrolytischen Dissoziation des Proteins erhält, und sie ist deshalb von der Konzentration des Proteins abhängig.

2. Die durch die Koagulation bewirkte Änderung der Wasserstoffionenkonzentration rührt von der Änderung der Proteinkonzentration her.

Bei der weiteren Bearbeitung der in dieser Abhandlung behandelten Fragen beabsichtigen wir, möglichst salzfreie Lösungen von möglichst reinen Proteinstoffen anzuwenden, und zwar, weil die Versuchsbedingungen unter solchen Umständen leichter nach Wunsch variiert werden können und die erhaltenen Resultate wahrscheinlich übersichtlicher werden. Wir sind indessen nicht blind dagegen, daß, je reiner die Proteinlösung dargestellt wird und je vollständiger die als „Puffer" wirkenden Körper entfernt werden, um so empfindlicher Säure- oder Basezusatz gegenüber die Proteinlösung sich zeigen wird, so daß es notwendig sein wird, eine möglichst genaue Methodik zu verwenden.[1])

C. Einfluß der Koagulationsdauer.

Beim Erwärmen eines koagulierten Albumins in neutraler, schwach saurer oder schwach alkalischer, wässeriger Lösung tritt nach und nach eine Spaltung, unter Bildung löslicher, stickstoffhaltiger Körper ein. Der Umfang dieser Spaltung hängt von der Temperatur, der Dauer des Erwärmens, der Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit und wahrscheinlich noch von mehreren Faktoren ab. Es ist somit einleuchtend, daß, wenn es sich um eine möglichst vollständige Ausscheidung koagulabler Stickstoffverbindungen handelt, auch die Koagulationsdauer ein nicht zu vernachlässigender Faktor ist. Bei einem zu kurzen Erwärmen geschieht es zuweilen, daß die Ausscheidung nicht vollständig wird, und erwärmt man zu lange, dann kann man Gefahr laufen, daß einmal ausgeschiedene Stickstoffkörper wieder in Lösung gehen.

Schon in der Einleitung ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß die Koagulation eines Serums schon durch eine $^1/_4$ bis $^1/_2$stündige Erwärmung in siedendem Wasser vollständig wird, während Eiweißlösungen sich ganz anders verhalten.

---

[1]) Wir lenken in dieser Beziehung die Aufmerksamkeit auf einige zutreffende Bemerkungen in ähnlicher Richtung von W. Pauli und R. Wagner, diese Zeitschr. 27, 302, 1910.

Einige Versuchsreihen, die diese Verhältnisse beleuchten, sollen in diesem Abschnitt eine nähere Erwähnung finden.

Tabelle XIII enthält die Ergebnisse zweier Versuchsreihen mit Serum, das ziemlich stark durch Hämoglobin verfärbt war. Die erste Reihe bezieht sich auf ein Serum, das 234 mg Stickstoff in 20 ccm enthielt und mit Schwefelsäure angesäuert wurde. Bei der anderen Reihe wurde ein Serum benutzt, das in 20 ccm 202 mg Stickstoff enthielt und mittels Essigsäure angesäuert wurde. In beiden Reihen wurden für jeden Versuch 20 ccm Serum, a ccm 0,1 n-Säure nebst (55 — a) ccm Wasser genommen; übrigens war die Versuchsanordnung die gewöhnliche.

Tabelle XIII.

Koagulation von Serum in verschiedenen Zeiten nach Zusatz von Schwefelsäure bzw. Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Schwefelsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in			Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in		
		1/4 Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg			1/4 Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg
1	7	4,51	4,66	5,35	9	7	5,40	6,12	8,15
2	8	3,99	—	4,79	10	8	4,28	4,78	6,19
3	9	3,86	3,92	4,62	11	9	3,70	3,91	4,72
4	10	3,84	3,91	4,73	12	10	3,39	3,50	4,12
5	11	3,89	4,02	4,89	13	11	3,21	3,31	3,99
6	12	4,00	4,22	5,26	14	12	3,22	3,31	4,00
7	13	4,20	4,62	5,78	15	13	3,22	3,30	3,98
8	14	4,60	5,00	6,27	16	14	3,31	3,38	4,11

Die Tabelle zeigt, daß das Filtrat nach 1stündigem Erwärmen mehr, wenn auch nur wenig mehr, Stickstoff als nach 1/4stündigem Erwärmen enthielt, und nach einer Koagulationsdauer von 3 Stunden sind die für den Stickstoffgehalt des Filtrats gefundenen Werte bedeutend zu hoch. In der Versuchsreihe mit Essigsäure liegt der Optimalpunkt beim Versuch Nr. 14 und scheint durch eine Verlängerung der Koagulationsdauer nicht geändert zu werden. Die Versuchsreihe mit Schwefelsäure hat ihr Optimum im Versuch Nr. 4, bei 1/4stündiger Erwärmung; bei 3stündiger Erwärmung dagegen scheint das Optimum ein wenig gegen die alkalische Seite hin verschoben. Es ist indes hier nur von so kleinen Abweichungen der ge-

fundenen Werte die Rede, daß die scheinbare Verschiebung sich leicht durch Versuchsfehler erklären läßt; wir haben nur deshalb darauf aufmerksam gemacht, weil Eiereiweißlösungen sich entgegengesetzt verhalten zu können scheinen (siehe S. 439).

Da der Unterschied der Koagulationszeiten in den hier beschriebenen 2 Versuchsreihen ziemlich groß ist, so machten wir einige ergänzende Versuche, teils mit Serum, teils mit Eiweißlösung, in denen dieser Unterschied weit kleiner war und wo in sämtlichen Versuchen die für die Koagulation optimale Salzsäuremenge als Säuerungsmittel angewandt wurde.

In der ersten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

40 ccm rotes Serum (445 mg Stickstoff enthaltend),
20 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_H = 4{,}66$.

In der zweiten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

50 ccm Eiweißlösung (266 mg Stickstoff enthaltend),
10 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_H = 4{,}69$.

In der dritten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

50 ccm Eiweißlösung (271 mg Stickstoff enthaltend),
10 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_H = 4{,}69$.

Das Verfahren war im übrigen wie gewöhnlich. Es wurde auf 100 ccm verdünnt und der Stickstoffgehalt von 50 ccm des Filtrats bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle XIV zusammengestellt.

Aus Tabelle XIV ersieht man deutlich, daß für Serum die optimale Koagulationsdauer etwa $^1/_2$ Stunde ist, daß aber Variationen von $^1/_4$ bis 1 Stunde ohne Belang sind. Betreffs der Eiereiweißlösungen sieht man, daß in beiden Versuchsreihen das Filtrat stets ärmer an Stickstoff wird, je länger die Koagulationsdauer wird.

Tabelle XIV.

Koagulation von Serum bzw. Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten nach Zusatz von Salzsäure.

Erste Reihe (Serum)			Zweite Reihe (Eiweiß)			Dritte Reihe (Eiweiß)		
Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg
17	5	12,20	25	5	16,65	33	10	13,12
18	10	6,95	26	10	—	34	20	10,38
19	15	6,50	27	15	12,25	35	30	9,13
20	20	6,48	28	20	11,12	36	45	8,30
21	30	6,45	29	25	10,52	37	60	7,88
22	60	6,51	30	30	10,02	38	90	7,25
23	90	6,70	31	40	9,60	39	120	7,00
24	120	7,00	32	60	8,63	40	180	6,26

Um das Verhalten der Eiweißlösungen in dieser Beziehung noch etwas weiter zu erforschen, haben wir außer einigen orientierenden Versuchen, die hier nicht weiter erwähnt werden sollen, 2 Versuchsreihen angestellt, deren Ergebnisse in den Tabellen XV und XVI zusammengestellt sind. In beiden Reihen kam Salzsäure als Säuerungsmittel zur Anwendung, und es wurde bei 6 verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen und in verschiedenen Zeiten koaguliert. Für jeden Versuch kamen 50 ccm Eiweißlösung (die in erster Reihe 266 mg, in zweiter 264 mg Gesamtstickstoff enthielt), a ccm 0,1 n-Salzsäure und (20 — a) ccm Wasser zur Anwendung. Das Verfahren sonst wie üblich; es wurde auf 100 ccm verdünnt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt.

Tabelle XV.

Koagulation von Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in						
		½ Std. mg	1 Std. mg	2 Std. mg	4 Std. mg	6 Std. mg	8 Std. mg	10 Std. mg
41	9,0	13,65	12,95	13,31	13,51	13,51	13,84	13,76
42	10,0	10,25	9,18	8,56	8,07	8,20	8,21	8,51
43	10,5	10,14	8,88	8,10	7,92	7,10	7,59	7,84
44	11,0	10,58	9,32	8,66	8,14	7,27	7,59	8,14
45	11,5	12,06	10,80	10,51	9,77	9,25	9,25	9,25
46	12,0	13,10	11,91	11,78	11,18	10,92	11,03	11,03

Tabelle XVI.

Koagulation von Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in				
		1/4 Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg	8 Std. mg	12 Std. mg
47	9,0	15,71	15,43	15,47	15,90	16,80
48	10,0	13,39	11,17	10,30	10,83	11,84
49	10,5	12,47	9,69	8,88	9,24	10,32
50	11,0	13,10	9,47	8,44	8,21	9,03
51	11,5	14,28	10,66	9,84	9,03	9,18
52	12,0	15,50	12,20	10,92	10,55	10,40

Aus den Tabellen XV und XVI, besonders deutlich aus der letzteren, ersieht man, daß der Minimumwert des Gehalts an nicht koagulablen Stickstoffkörpern — ein Wert, der von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängt — desto schneller erreicht wird, je weniger sauer die Lösung ist. In Versuch Nr. 47 ist der Minimumwert schon nach Verlauf von 1 Stunde erreicht, in Nr. 48 und 49 erst nach Verlauf von 3 Stunden, in Nr. 50 und 51 erst nach Verlauf von 8 Stunden, und endlich in Nr. 52 gibt eine Erwärmungsdauer von 12 Stunden den niedrigsten Wert für den Gehalt an nicht koagulierbaren Stickstoffverbindungen. Die Ursache hierzu ist nicht bestimmt anzugeben, wahrscheinlich spielt es aber eine Rolle, daß die Wasserstoffionenkonzentration sich während der Koagulation nach der alkalischen Seite hin verschiebt (bei langer Erwärmung wirkt das Alkali des Glases in derselben Richtung), wodurch die sauersten Lösungen nach und nach die optimale Wasserstoffionenkonzentration bekommen, während die weniger sauren Lösungen entweder alkalisch oder wenigstens so schwach sauer werden, daß eine Spaltung und eine Lösung des einmal Auskoagulierten eintreten.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation liegt, was die erste Versuchsreihe (Tabelle XV) betrifft, für sämtliche Koagulationszeiten bei Versuch Nr. 43. Betreffs der anderen Reihe (Tabelle XVI) findet man die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei dem entsprechenden Versuch Nr. 49, wenn die Koagulationsdauer 1/4 Stunde ist; für die übrigen Koagulationszeiten dagegen besitzt die ein wenig saurere Lösung

in Nr. 50 die optimale Wasserstoffionenkonzentration. Wird somit die Koagulationsdauer verlängert, so scheint also der Optimalpunkt sich etwas gegen die saure Seite hin zu verschieben (vgl. S. 435); erinnert man sich, daß die Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation kleiner wird, so ist auch dieses Verhältnis leicht zu verstehen.

Vollständigkeitshalber möchten wir anführen, daß wir größere Mengen der den Gemischen Nr. 49 und 50 entsprechenden Lösungen dargestellt und in denselben die Wasserstoffionenkonzentration elektrometrisch gemessen haben, und zwar sowohl vor der Koagulation als auch in den Filtraten, die wir nach Koagulation in gegebener Zeit, Kühlung, Verdünnung mit Wasser in demselben Verhältnis wie in den Versuchen Nr. 49 und 50 und nachfolgender Filtrierung gewonnen haben.

Nr. 49.	Vor der Koagulation		$p_{H'} = 4{,}68$
	Nach „ „	in $^1/_4$ Stunde	$p_{H'} = 5{,}51$
	„ „ „	„ 1 „	$p_{H'} = 5{,}62$
Nr. 50.	Vor „ „	. . . . .	$p_{H'} = 4{,}50$
	Nach „ „	in 1 Stunde	$p_{H'} = 5{,}33$

Aus den hier beschriebenen Versuchen geht hervor, daß bei der Wärme eines Wasserbades die Ausscheidung der koagulierbaren Proteinstoffe einer Eiereiweißlösung, oder jedenfalls einiger derselben, eine ziemlich beträchtliche Zeit erfordert, und daher wahrscheinlich mit chemischen Veränderungen oder Umlagerungen innerhalb des Proteinstoffmoleküls verknüpft sein muß. Die Versuche zeigen einen großen Unterschied zwischen Serum und Eiweißlösungen; dieser wird aber vielleicht eher als ein Unterschied zwischen den Umlagerungsgeschwindigkeiten während der Gerinnung aufzufassen sein.

Daß es bei der Koagulation von Eiweißlösungen sich wirklich um einen doppelten Prozeß handelt, und zwar teils um eine Ausfällung koagulabler Proteinstoffe und teils um eine Wiederauflösung unter hydrolytischer Spaltung derselben, das konnten wir durch die unten beschriebene Versuchsreihe leicht nachweisen.

Bei sämtlichen Versuchen wurde dieselbe Eiweißlösung benutzt. Sie wurde zuerst mit ganz wenig überschüssiger Salzsäure angesäuert, mittels Wasserstoffdurchleitung von Kohlensäure befreit und nachher mit

Natriumhydroxyd bis zur Erreichung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration versetzt. Von der auf diese Weise zubereiteten Lösung wurden Proben in siedendem Wasser in verschieden langen Zeiten unter wiederholtem Umschütteln erwärmt und dadurch koaguliert. Sowohl in der nicht koagulierten Lösung als auch in den Filtraten vom Gerinnsel wurde die Wasserstoffionenkonzentration, der Gesamtstickstoff, der Gehalt an formoltitrierbarem Stickstoff und der Verbrauch an 0,2 n-Natriumhydroxydlösung sowohl bis zur Lackmusneutralität als auch bis zur schwach roten Farbe mit Phenolphthalein ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle XVII wiedergegeben.

Tabelle XVII.

Koagulationsdauer in Stunden	40 ccm Lösung					Die Wasserstoffionenkonzentration
	verbrauchten, um Lackmuspapier gegenüber neutral zu werden, a ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	verbrauchten, um mit Phenolphthalein schwach rote Farbe anzunehmen, in allem b ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	enthielt c mg Gesamtstickstoff	enthielt d mg formoltitrierbaren Stickstoff	d in % von c ausgedrückt	
	a	b	c	d		$p_{H'}$
Die nicht koagulierte Lösung	1,86	2,08	181,7	8,34	4,59	4,70
1 Stunde	0,13	0,15	11,83	0,48	4,06	5,41
3 Stunden	0,14	0,18	10,58	0,64	6,05	5,43
6 „	0,15	0,20	10,49	0,98	9,34	5,53
12 „	0,21	0,28	12,95	1,79	13,82	5,52
24 „	0,22	0,40	17,18	2,94	17,11	5,60

Der vierte Stab der Tabelle läßt deutlich hervorgehen, daß nach 1stündigem Erwärmen die Koagulation nicht vollständig ist; erst nach 3 bis 6stündiger Erwärmung erreicht der Stickstoffgehalt des Filtrats ein Minimum. Aus dem zweiten, dritten und fünften Stab der Tabelle ist aber außerdem zu ersehen, daß sowohl die zur Neutralisation erforderliche Menge Natriumhydroxyd als auch die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffes ganz allmählich zunehmen, ob die Koagulation beendet ist oder nicht.

Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs steigt, wie es aus dem sechsten Stabe der Tabelle hervorgeht, in weit stärkerem Maße als die des Gesamtstickstoffs, was seine natür-

liche Erklärung dadurch findet, daß es nicht nur das Gerinnsel, sondern wahrscheinlich besonders die in Lösung befindlichen Körper sind, die, durch verlängerte Erwärmung gespalten, weiter hydrolysiert werden.

Daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht stetig sinkt, sondern bei fortgesetzter Erwärmung sich einigermaßen konstant erhält, wird leicht zu verstehen sein, wenn man bedenkt, daß durch diese eine Auskoagulation des Proteins verhindert wird, während von einer Lösung des Gerinnsels unter hydrolytischer Spaltung, das heißt unter Bildung von gleichvielen Amino- und Carboxylgruppen, anzunehmen ist, daß sie die Wasserstoffionenkonzentration entweder vergrößert oder doch wenigstens dazu beiträgt, sie konstant zu erhalten.

Übrigens wollen wir uns aller Betrachtungen über das Wesen des Koagulationsprozesses enthalten und schließlich nur noch einen kleinen, leicht ausführbaren, aber sehr lehrreichen Versuch anführen, der zeigt, daß auch Adsorptionsphänomene bei der Auskoagulation eine Rolle spielen.

Für den Versuch wurde angewandt eine Mischung von:

600 ccm etwa 4%iger Eiweißlösung,
120 „ 0,1 n-Salzsäure und
120 „ Wasser.

Diese Mischung hatte die für die Koagulation optimale Konzentration der Wasserstoffionen, indem $p_H = 4{,}69$ gefunden wurde.

400 ccm der Mischung wurden durch $^1/_2$stündiges Erhitzen in siedendem Wasser koaguliert, und dann in kaltem Wasser $^1/_2$ Stunde gekühlt, wonach etwa 200 ccm abfiltriert wurden.

30 ccm dieses Filtrates enthielten 8,62 mg N.

Danach wurden die folgenden 3 Flüssigkeiten 2 Stunden in siedendem Wasser erwärmt:

a) 50 ccm des Filtrats ohne jeglichen Zusatz,

b) 50 ccm des Filtrats, die mit etwas vom Gerinnsel versetzt worden waren, und

c) der Rest der Hauptportion, in dem der weitaus größte Teil des Gerinnsels sich noch befand.

Nach der 2stündigen Erwärmung wurden die 3 Portionen filtriert, wonach der Gesamtstickstoff in 30 ccm der Filtrate ermittelt wurde.

30 ccm des Filtrats von Versuch a) enthielten 8,50 mg N
30 „ „ „ „ „ b) „ 7,98 „ „
30 „ „ „ „ „ c) „ 5,50 „ „

Ein anderer Versuch, der mit 400 ccm derselben Mischung in ganz derselben Weise ausgeführt wurde, nur mit dem Unterschiede, daß das Abfiltrieren der 200 ccm unmittelbar nach dem $^1/_2$stündigen Erwärmen ohne Abkühlung stattfand, hat ganz ähnliche Resultate gegeben:

30 ccm des ersten Filtrats (die ca. 200 ccm) enthielten 9,60 mg N
30 „ „ Filtrats vom Versuch a) „ 9,44 „ „
30 „ „ „ „ „ b) „ 8,92 „ „
30 „ „ „ „ „ c) „ 5,82 „ „

Aus diesen 2 Versuchen geht hervor, daß, wenn das durch Erwärmung in der ersten halben Stunde gebildete Gerinnsel abfiltriert wird, so kann das Filtrat weiter erwärmt werden, ohne daß, praktisch genommen, dadurch mehr Gerinnsel gebildet wird. Versetzt man dagegen das Filtrat mit etwas vom abfiltrierten Gerinnsel, um dann aufs neue zu erwärmen und zu filtrieren, so wird der Gesamtstickstoff des Filtrats deutlich vermindert, und erwärmt man in Gegenwart von reichlichen Mengen des Gerinnsels, dann erleidet der Stickstoffgehalt der Lösung sogar eine sehr bedeutende Abnahme.

Zur Kenntnis der Reduktionsfermente.

I. Mitteilung.

Über das Schardinger-Enzym (Perhydridase).

Von

A. Bach.

(Privatlaboratorium Genf.)

(Eingegangen am 24. Februar 1911.)

Die Fähigkeit organischer Materien tierischer und pflanzlicher Herkunft, Nitrate in Nitrite überzuführen, wurde von Schönbein[1]) bereits im Jahre 1861 beobachtet und mit den katalytischen Eigenschaften dieser Materien dem Hydroperoxyd gegenüber in Zusammenhang gebracht. Er hob hervor, daß die Blutkörperchen, die in bekannter Weise auf Hydroperoxyd katalytisch einwirken, auch Nitrate zu Nitriten reduzieren, und daß die katalytischen Eigenschaften beider Arten durch Blausäure in gleicher Weise aufgehoben werden.

Zahlreiche Forscher beschäftigten sich seitdem mit den reduzierenden Eigenschaften der Zellen, es herrscht aber bisher auf diesem Gebiet die größte Verwirrung und Unsicherheit. Während die einen (Rey-Pailhade, Pozzi-Escot, Abelous und seine Mitarbeiter) an die Existenz reduzierender Fermente glauben, sehen die anderen (Heffter und seine Mitarbeiter, Kastle und Elvove) die beobachteten Reduktionserscheinungen als nichtfermentative Prozesse an. Die Sachlage wird hinreichend schon dadurch charakterisiert, daß C. Oppenheimer[2]) in seinem ausgezeichneten Lehrbuch den Reduktionsfermenten nur einige Zeilen widmet, in denen er die Existenz derartiger Fermente in Abrede stellt. Hier ist nicht der Ort, auf die kritische Besprechung des sehr umfangreichen Materials einzugehen. Hervorgehoben sei nur eine grundlegende, von Schardinger[3]) herrührende Beobachtung, die

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 84, 193. 1861. Zeitschr. f. Biol. 3, 140.

[2]) Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1909.

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 5, 22, 1902. Chem.-Zeitg. 28, 704, 1904.

meiner Ansicht nach den Schlüssel zum Verständnis der im Pflanzen- und Tierkörper sich abspielenden fermentativen Reduktionsvorgänge gibt.

Schardinger stellte fest, daß frische Kuhmilch, die für sich auf Methylenblau, Natriumindigosulfonat usw. bei 70° ohne Einwirkung ist, in Gegenwart von Formaldehyd oder Acetaldehyd diese Farbstoffe zu den entsprechenden Leukobasen rasch reduziert. Mit gekochter Milch bleibt die Reaktion völlig aus. In einer sorgfältig ausgeführten Arbeit wies R. Trommsdorff[1]) nach, daß die Schardinger-Reaktion durch ein in der Milch präformiertes Ferment, und nicht durch irgend ein Produkt der bakteriellen Wirkung, ausgelöst wird, da auch völlig keimfrei ermolkene Milch diese Reaktion gibt. Andererseits reduziert unter Umständen mit Bakterien infizierte Milch Methylenblau auch in Abwesenheit von Aldehyden. Daraus ergibt sich, daß das Schardinger-Enzym mit der sogenannten „Reduktase" nicht identisch ist, da es nur in Anwesenheit von Aldehyden reduzierend wirkt. Trommsdorff bemerkt dazu, daß durch die Feststellung dieser Tatsachen für das Verständnis der Schardingerschen Reaktion noch gar nichts gewonnen war. Diese Schlußfolgerung ist indessen nur dann richtig, wenn man die Reaktion vereinzelt betrachtet. Berücksichtigt man aber die bereits auf dem Gebiete der Oxydationsfermente gemachten Erfahrungen einerseits und einige rein chemische Reduktionsvorgänge andererseits, so kommen hier höchst interessante Analogien zum Vorschein. Gerade bei meinen Untersuchungen über Oxydationsfermente stieß ich auf einige Beobachtungen, die meine Aufmerksamkeit auf das Gebiet der biologischen Reduktionsvorgänge lenkten und zu vorliegender Arbeit Veranlassung gaben.

Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten, von Farbstoffen zu Leukobasen usw. durch pflanzliche und tierische Gewebe setzt die Vermittelung von aktivem bzw. naszierendem Wasserstoff voraus. Da letzterer nur dem Wasser entstammen kann, so suchte ich[2]), um Aufschlüsse über diese Reduktionsprozesse zu gewinnen, die Reaktionen, bei denen Wasserspaltung unter Wasserstoffentbindung stattfindet, in Erörterung zu ziehen. Als völlig klar und eindeutig erwies sich die Reaktion, die zwischen Hypophosphiten und Wasser in Gegenwart von Palladium verläuft. Setzt man einer wässerigen Hypophosphitlösung etwas Palladiummohr zu, so wird die hypophosphorige Säure in phosphorige umgewandelt und Wasserstoff in Freiheit gesetzt. Die quantitative Untersuchung ergab, daß der Hauptsache nach die Reaktion sich nach der Gleichung $PO_2H_3 + 2HOH = PO_3H_3 + H_2O + H_2$ vollzieht. Fügt man dem Gemisch eine reduzierbare Substanz, z. B. Methylenblau, zu, so wird gleichzeitig mit

[1]) Centralbl. f. Bakt. 49, 291, 1909.

[2]) Chem. Berichte 42, 4463, 1909.

der Oxydation der hypophosphorigen Säure die Reduktion dieser Substanz bewirkt.

Es ist leicht zu ersehen, daß zwischen dieser Reaktion und der Schardingerschen eine große Analogie besteht. Noch deutlicher wird diese Analogie, wenn man in Betracht zieht, daß es Bredig und Sommer[1]) gelungen ist, in der Schardingerschen Reaktion das Milchferment durch kolloidale Metalle der Platingruppe (Iridium, Platin, Palladium) zu ersetzen. Man ist nunmehr zu der Annahme völlig berechtigt, daß der Wirkung der Systeme:

Palladium—Methylenblau—Hypophosphit—Wasser,
Palladium—Methylenblau—Aldehyd—Wasser,
Milchferment—Methylenblau—Aldehyd—Wasser

dieselbe Reaktion — die Spaltung des Wassers durch die oxydable Substanz unter Mitwirkung eines Katalysators, der mit dem Wasserstoff des Wassers eine labile, stark reduzierende Verbindung bildet — zugrunde liegt.

Nachdem hiermit das Wesen der Schardingerschen Reaktion mir als aufgeklärt erschienen war, versuchte ich, die Beziehungen des Schardinger-Enzyms zu der in den Geweben angeblich vorhandenen Redukase[2]) näher zu ermitteln. Die Leber sowie andere Organe enthalten bekanntlich ein Prinzip, das Methylenblau und andere Farbstoffe zu den entsprechenden Leukobasen reduziert und durch Kochhitze zerstört wird. Andererseits aber enthält die Leber eine oder mehrere Aldehydasen, die Aldehyde unter Wasserspaltung in die entsprechenden Alkohole und Säuren überführt. Der Gedanke lag nahe, daß zwischen der Redukase, der Aldehydase und dem Schardinger-Enzym irgend ein Zusammenhang besteht. Um Aufschlüsse über diesen Gegenstand zu gewinnen, versuchte ich, den Einfluß der Aldehyde auf die Reduktion des Methylenblaues durch Lebergewebe kennen zu lernen.

Frische Kalbsleber reduziert Methylenblau sehr energisch. Schlämmt man 2 g Leberbrei in 10 ccm Wasser auf, setzt 1 ccm Schardingersche

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 70, 34, 1909.

[2]) Ich schlage vor, die etymologisch fehlerhafte Bezeichnung „Reduktase" durch Redukase zu ersetzen. Man kann ebensowenig „Reduktase" für Redukase, wie „Oxydatase" für Oxydase sagen.

Methylenblaulösung[1]) zu und erhitzt das Gemisch im Wasserbad auf 70°, so erfolgt in kürzester Zeit die Entfärbung des Methylenblaus. Mit zum Kochen erhitzten Leberbrei bleibt die Reduktion aus. Stellt man vergleichende Versuche mit und ohne Aldehydzusatz an, so beobachtet man, daß je nach den zugesetzten Mengen der Aldehyd (Formaldehyd, Acetaldehyd) keinen oder sogar einen hemmenden Einfluß auf die Reduktion des Methylenblaus ausübt. Ich konnte aber aus der Leber Präparate darstellen, die wie das Schardinger-Enzym die Reduktion des Methylenblaus durch Acetaldehyd außerordentlich beschleunigten.

Wird Leberbrei mit dem fünffachen Gewicht 2%iger Natriumfluoridlösung gut verrieben und durch ein Tuch gepreßt, so erhält man eine Emulsion, die, mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt auf Methylenblau bei 70° gar nicht oder äußerst langsam einwirkt, in Gegenwart von Acetaldehyd (1 ccm 1%ige Lösung für 20 ccm verdünnte Emulsion) dagegen den Farbstoff in wenigen Minuten reduziert. Mit zum Kochen erhitzter Emulsion bleibt die Reduktion aus. Die filtrierte Emulsion ist völlig unwirksam, der Rückstand bleibt aktiv. Es ist mir aber gelungen, das Ferment in Lösung zu bringen und von dem Lebergewebe völlig zu trennen. Leberbrei (Kalb) wird mit dem fünffachen Gewicht 1%iger Natriumbicarbonatlösung verrieben und im Eisschrank einige Stunden stehen gelassen. Das Gemisch wird dann colliert und die Colatur wird vorsichtig mit verdünnter Essigsäure neutralisiert. Nach Filtrieren erhält man eine völlig klare, rubinrote Flüssigkeit, die das Ferment in Lösung hält. Durch Versetzen der Flüssigkeit mit dem dreifachen Volumen starkem Alkohol wird das Ferment ausgefällt. Nach Entfernung des Fällungsmittels läßt sich das Ferment aus der Fällung mit ½%iger Natriumbicarbonatlösung extrahieren. Das vollkommen klare, farblose Filtrat, das für sich auf Methylenblau ohne Einwirkung ist, gibt nach Neutralisieren mit verdünnter Essigsäure in sehr schöner Weise die Schardingersche Reaktion. Das zum Sieden erhitzte Filtrat ist inaktiv. Das Temperaturoptimum liegt, wie bei dem Schardinger-Enzym, bei 70°. Wie das Schardinger-Enzym, ist das Ferment gegen Aldehydüberschuß sehr empfindlich. Acetaldehyd gibt bessere Resultate als Formaldehyd, wahrscheinlich wegen der größeren Giftigkeit des letzteren. Das Ferment ist sowohl in Lösung wie in festem Zustand ziemlich unbeständig. Es kann aus der Leber und anderen Organen (Lunge, Milz, Niere, Thymus) unter antiseptischen Bedingungen mittels einer Lösung, die 1% Natriumbicarbonat und 2% Natriumfluorid enthält, ausgezogen werden.

Aus obigem geht mit voller Klarheit hervor, daß die Redukase der Leber und anderer Organe kein einheitliches Ferment ist, sondern aus einem Anteil, der mit dem Schardinger-

[1]) 5 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung + 95 ccm Wasser.

Enzym identisch zu sein scheint, und einem anderen, der durch Aldehyde ersetzbar ist, besteht.

Die Verhältnisse gestalten sich hier genau wie bei der gewöhnlichen Oxydase (Phenolase) und der entsprechenden Peroxydase. Bekanntlich bewirkt die Oxydase für sich dieselben Oxydationsreaktionen, wie die Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd. Auf die Wirkung normaler Oxydase übt Hydroperoxyd je nach den Konzentrationsverhältnissen keinen oder sogar einen hemmenden Einfluß aus. In veränderter Oxydase kann der unbeständige Anteil durch Hydroperoxyd ersetzt werden. Der stabile Anteil der Oxydase — die Peroxydase — kommt in gewissen Objekten, z. B. in Meerrettigwurzeln — getrennt von dem unbeständigen — vor. Nun gilt das gleiche auch für das Reduktionsferment der tierischen Organe, wenn man Redukase für Oxydase, Aldehyd für Hydroperoxyd und Schardinger-Enzym für Peroxydase setzt. Während die Oxydase als ein System Peroxydase—peroxydbildender Körper (Oxygenase) aufzufassen ist, kann die Redukase nur als ein System Ferment — wasserspaltender Körper angesehen werden. Die Analogie zwischen der Oxydase und der Redukase ist eine so auffallende und weitgehende, daß man unwillkürlich an eine Ähnlichkeit der chemischen Prozesse, die der Wirkung dieser Fermente zugrunde liegen, denkt. Zur Orientierung der weiteren Bearbeitung des Gebietes gestatte ich mir, über diesen Gegenstand folgende Ansicht kurz auszusprechen.

Die Theorie der elektrolytischen Dissoziation setzt voraus, daß Wasser, zu einem minimalen Teil in die Ionen H′ und ′OH gespalten, auftritt.

Da bei der Vierwertigkeit des Sauerstoffs Wasser auch ungesättigte Moleküle $H_2O<$ enthalten muß — der ungesättigte Zustand des Wassers ist wohl als die Grundursache der elektrolytischen Dissoziation anzusehen —, so ist es denkbar und mit den jetzt in der physikalischen Chemie zutage tretenden Anschauungen (Jones, Armstrong) völlig vereinbar, daß die H′- and ′OH-Ionen sich zum Teil mit ungesättigten Wassermolekülen zu labilen Verbindungen vereinigen. Aus den Wasserstoffionen entstehe dabei der Komplex $H_2O<{}'H_2$, aus den Hydroxylionen der Komplex $H_2O<('OH)_2$. Ersterer sei nichts anderes als

das hypothetische Wasserstoffsuboxyd oder Oxyperhydrid H_4O, dessen metallische Analoga M_4O wohl bekannt sind; letzteres sei das Hydroperoxydhydrat.

Betrachten wir etwas näher im Lichte dieser Annahme eine auf der Spaltung des Wassers basierende Reaktion, z. B. die von Bredig und Sommer[1]) untersuchte Reaktion zwischen Methylenblau, Formaldehyd und Wasser in Gegenwart von kolloidalem Platin. Weder für sich allein, noch vereinigt sind Methylenblau und Formaldehyd imstande, Wasser bei 70° mit meßbarer Geschwindigkeit zu spalten und sich auf Kosten desselben zu reduzieren bzw. zu oxydieren. Die Reaktion tritt aber sofort ein, wenn man dem Gemisch beider Stoffe in wässeriger Lösung kolloidales Platin zufügt. Worauf beruht der beschleunigende Einfluß des Platins? Von Engler und Wöhler[2]) ist der Beweis erbracht worden, daß der Beschleunigung von gewissen Oxydationsprozessen durch fein verteiltes Platin die Bildung von Platinperoxyd zugrunde liegt, wobei das primär entstehende Peroxyd PtO_2 sich mit Wasser zum sehr wirksamen Platinperoxydhydrat HO.Pt.OOH vereinigt, Bei der Einwirkung von Platin auf Hydroperoxyd entsteht dieselbe Verbindung, die in Anwesenheit von oxydablen Substraten dieses oxydiert, in Abwesenheit von Substraten unter Sauerstoffentwicklung zerfällt (Platinkatalyse des Hydroperoxyds). Die Beschleunigung der Oxydation des Formaldehyds im System Methylenblau—Formaldehyd—Wasser läßt sich daher in einfacher Weise erklären, wenn man annimmt, daß der labile Komplex $H_2O < ('OH)_2$ sich mit Platin zu Platinperoxydhydrat vereinigt, wodurch eine weitere Dissoziation des Wassers hervorgerufen werden muß.

Bei der Beschleunigung der Reduktion des Methylenblaus spielt wahrscheinlich das Platin eine ähnliche Rolle, wie bei der Beschleunigung der Oxydation des Methylenblaus, indem es sich mit dem Komplex $H_2O = 'H_2$ bzw. mit Wasserstoffionen und Wasser zu einem wirksamen Platinwasserstoffhydrat verbindet.

Für das Palladium ist eine derartige Verbindung bereits bekannt. Denn das von Paal und Gerum[3]) dargestellte außer-

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. anorgan. Chem. 29, 1, 1902.

[3]) Chem. Berichte 41, 805, 1908.

ordentlich wirksame, flüssige Hydrosol des Palladiumwasserstoffs ist nichts anderes als das Palladiumoxyperhydrid $PdOH_2$.

Die bekannte Eigenschaft des Platins, Palladiums usw., sich sowohl mit Wasserstoff wie mit Sauerstoff zu verbinden, setzt voraus, daß diese Metalle den Reduktionsprozeß und den Oxydationsprozeß in der Schardinger-Reaktion gleichzeitig beschleunigen: sie fungieren als Ambokatalysatoren. Dagegen wirken die in lebenden Wesen tätigen Katalysatoren spezifisch. Die auf der intermediären Bildung von labilen Sauerstoffverbindungen — Peroxyden — beruhenden Oxydationsprozesse werden durch die Peroxydase beschleunigt, die auf der Wasserspaltung und intermediärer Bildung von labilen Wasserstoffverbindungen (Perhydriden) beruhenden Reduktionsprozesse werden durch das Schardinger-Enzym beschleunigt. Die Analogie zwischen diesen Fermenten fußt auf der chemischen Ähnlichkeit der Körper, mit denen sie in Reaktion treten: bei der Peroxydase hat man es mit dem Hydroperoxyd $H_2O<O$ und seinen Derivaten, bei dem Schardinger-Enzym mit dem Oxyperhydrid $H_2O<H_2$ und seinen Derivaten zu tun.

Diese Auffassung, die natürlicherweise nur als eine Orientierungshypothese angesehen werden kann, gestattet, das Gebiet der biologischen Reduktionsvorgänge in planmäßige Bearbeitung zu nehmen und ist einer weitgehenden experimentalen Prüfung zugänglich.

Zum Schlusse noch einige Worte betreffend die Nomenklatur der Reduktionsfermente. Das Milchferment, das die Reduktion von Farbstoffen in Gegenwart von Aldehyden beschleunigt, wurde von Smidt als Aldehydkatalase, von Jensen als Aldehydreduktase, von Seligmann als indirekte Reduktase, von Trommsdorff[1]) vorläufig als Schardinger-Enzym bezeichnet. Mit Rücksicht auf die im obigen erörterten Tatsachen und Analogien schlage ich vor, das Ferment mit dem Namen Perhydridase zu belegen. Die allgemeine Bezeichnung „Reduktase" ist, wie oben erwähnt, durch Redukase zu ersetzen.

Weitere Versuche über die Perhydridase sind im Gang.

[1]) Literatur bei Trommsdorff, Centralbl. f. Bakt. 49, 300, 1909.

Die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze.

Von

Jacques Loeb

(unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys).

(Aus dem Rockefeller Institut, New York.)

(Eingegangen am 7. Februar 1911.)

I. Der Entgiftungskoeffizient KCl/NaCl.

1. Das biologische Verhältnis von KCl:NaCl.

Mit der folgenden Arbeit beabsichtige ich die Versuche über antagonistische Salzwirkungen und physiologisch äquilibrierte Salzlösungen wieder aufzunehmen, die im Jahre 1902 durch meine Übersiedelung nach Californien unterbrochen wurden.

Auf die reiche Literatur dieses Gebietes möchte ich hier nicht eingehen. Statt dessen verweise ich den Leser auf die ausführliche und treffliche Behandlung, die dieselbe kürzlich durch T. B. Robertson erfahren hat.[1])

Das Problem, das meine neuen Arbeiten behandeln sollen, ist eine Feststellung der Gesetze, nach denen sich die drei, für die Physiologie so wichtigen Salze, NaCl, KCl und $CaCl_2$ im Seewasser und im Serum gegenseitig entgiften; ferner die Entscheidung darüber, ob der Antagonismus zwischen zwei Salzen zwischen den Ionen mit gleicher oder entgegengesetzter elektrischer Ladung stattfindet; und endlich die Ermittlung des Mechanismus, auf den die Entgiftung zurückzuführen ist.

Die vorliegende Mitteilung behandelt die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze.

---

[1]) T. B. Robertson, Über die Verbindung der Proteine mit anorganischen Substanzen und ihre Bedeutung für die Lebensvorgänge; Ergebnisse der Physiologie 10, 1910.

Was die Entgiftung von KCl durch NaCl betrifft, so sei zunächst an die bekannten Ausführungen von Bunge erinnert, daß Pflanzenfresser alle Chlornatriumhunger zeigen. Bunge erklärt das so, daß in der Pflanzennahrung relativ viel Kaliumsalze in der Form von Carbonaten, Phosphaten oder Citraten usw., aufgenommen werden. Mit dem im Blut des Tieres enthaltenen NaCl sollen sich dann beispielsweise Natriumphosphat und Kaliumchlorid bilden, die aber beide durch die Niere ausgeschieden werden. Das bedinge eine relative Chlornatriumverarmung des Tieres und bedinge den Chlornatriumhunger der Herbivoren.

Es sei von vornherein bemerkt, daß diese Theorie von Bunge sich für unsere Versuche nicht verwerten läßt, weil es sich in den letzteren um giftige Dosen von KCl handelt, wodurch die Tiere einer typischen Kaliumvergiftung zum Opfer fallen. Das Kalium ist ein spezifisches Nerv- und Muskelgift, und diese Vergiftung wird in unseren Versuchen durch Zusatz von NaCl verhindert, vermutlich in der Weise, daß der Zusatz von NaCl die Geschwindigkeit des Eindringens von KCl in den Körper der Fische hindert. Nach Bunge sollte bei der Fütterung mit KCl ja überhaupt keine Verarmung an NaCl eintreten. Ich will aber nicht behaupten, daß die Theorie von Bunge für die Erklärung des Chlornatriumhungers der Herbivoren nicht zutreffe.

Während es in der Literatur nicht an Beobachtungen über teilweise Entgiftung von NaCl durch KCl fehlt, sind wenige Beobachtungen über die Entgiftung von KCl durch NaCl vorhanden. Osterhout[1]) stellte Versuche über die gegenseitige Entgiftung von KCl und NaCl an Weizen an, in dem er das Wachstum der Wurzeln in verschiedenen Mischungen von KCl und NaCl bestimmte. Seine Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Kulturflüssigkeit (Konzentration 0,12 M)	Totales Längenwachstum der Wurzeln einer Pflanze während 30 Tagen (Mittelwert) mm
KCl	67
30 ccm KCl 100 „ NaCl	185,5
20 ccm KCl 100 „ NaCl	160,4
15 ccm KCl 100 „ NaCl	146
10 ccm KCl 100 „ NaCl	134
5 ccm KCl 100 „ NaCl	94,4
NaCl	55

[1]) Osterhout, Jahrb. f. wissenschaftl. Botan. 46, 124, 1908.

Für Versuche über die Entgiftung von KCl sind höhere Tiere besser geeignet, weil hier vermöge der spezifischen Giftwirkungen kleinerer Dosen von KCl die Gesetze für die Entgiftung dieses Salzes durch andere Salze besser zutage treten lassen.

Kalium und Natrium existieren nach van't Hoff im Seewasser in einem bestimmten molekularen Verhältnis, nämlich 2,2 Moleküle KCl auf 100 Moleküle NaCl. Ich habe nun schon früher darauf hingewiesen, daß dasselbe Verhältnis angenähert auch in dem Blutserum besteht. Hier liegt aber eine Schwierigkeit darin vor, daß Kalium in zwei spezifisch verschiedenen Arten von Verbindungen vorkommen kann, nämlich als Bestandteil komplexer organischer Radikale, aus denen es nicht als Ion dissoziierbar ist; und zweitens in der Form von Kaliumsalzen, aus denen es als Ion dissozierbar ist. Bei der Aschenbestimmung des Serums erhält man die Summe des Kaliums in beiden Arten von Verbindungen, während für die antagonistischen, d. h. schützenden Salzwirkungen nur die eine Klasse in Betracht kommt, in der das Kalium als Ion dissoziiert werden kann. Für die Durchspülung des Froschherzens oder des Herzens der Schildkröte benutzt man $^m/_8$ NaCl-Lösungen. Will man einer solchen Lösung KCl in dem Verhältnis zusetzen, in dem es im Seewasser existiert, so daß das molekulare Verhältnis von KCl zu NaCl wie 2,2:100 ist, so muß man 0,021 56 g KCl zu 100 ccm der Lösung zufügen. Die Ringersche Lösung enthält nur $^1/_3$ dieser Quantität KCl, nämlich 0,0075 g, und die Lockesche Lösung das Doppelte, nämlich 0,042 g. In einer soeben erschienenen Arbeit teilt nun Vernon[1]) mit, daß man bessere Resultate erhält, wenn man mehr KCl zufügt als Ringer und weniger als Locke. Er findet als Optimum 0,021% KCl. Das ist aber genau das Verhältnis, das man unter der Voraussetzung anwenden sollte, daß auch im Serum die K-Ionen zu den Na-Ionen im molekularen Verhältnis von 2,2:100 vorhanden sind. Ich glaube demnach schließen zu müssen, daß das Verhältnis von 2,2 Molekülen KCl zu 100 Molekülen NaCl nicht nur für Seetiere, sondern allgemein für die optimalen Durchspülungsflüssigkeiten gilt, und daß es sich hier um eine biologische Konstante handelt.

Die Versuche, die hier mitgeteilt werden, sind an einem marinen Fisch, Fundulus, angestellt, dessen Eier zu meinen früheren Versuchen gedient hatten. Diese Fische bieten den Vorteil, daß sie innerhalb der für unsere Zwecke erforderlichen Konzentrationsgrenzen vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig sind. Das erlaubt uns, bei Konstanthaltung der Konzentration des toxischen Salzes die des entgiftenden Salzes beliebig zu variieren, ohne daß es nötig ist, noch einen dritten Stoff zur Konstanthaltung des osmotischen Druckes zuzufügen.

Ehe die Fische in die zum Versuche dienenden Lösungen gebracht wurden, wurden sie zweimal in Süßwasser und dann

[1]) Vernon, Journ. of Physiol. 40, 295, 1910.

noch einmal in destilliertem Wasser gewaschen und so von allen Spuren Seewasser befreit. Je 6 Fische wurden stets in 500 ccm einer Lösung gebracht, und es wurde dann jeden Tag die Zahl der überlebenden Fische festgestellt.

Man hat als störende Variable in diesen Versuchen den Umstand zu berücksichtigen, daß gelegentlich einzelne Fische kränklich sind (Infektion durch Saprolegnia usw.) und daß daher in Fällen, in denen 6 Fische überleben sollten, gelegentlich nur 4 Fische oder nur 3 Fische überlebten. Solche zufällige Störungen konnten durch Wiederholung der Versuche ausgeglichen werden. Im allgemeinen sind die Resultate so scharf, daß man ohne weiteres diese zufälligen Störungen als solche erkennt. Was die Versuchsdauer betrifft, so war dieselbe gewöhnlich 2 bis 4 Wochen. Nach 2 Wochen macht sich gelegentlich, namentlich bei höher konzentrierten Lösungen, der Effekt der Verdunstung bemerkbar. Man erhält meist schon nach 1 bis 2 Wochen klare Resultate.

Es war unmöglich, bei den zahlreichen Versuchen, die wir anstellen mußten, die Temperaturen konstant zu halten. Das bedingt z. B. die kleinen Schwankungen, die der Leser in der Lebensdauer der Fische in derselben Lösung, aber in verschiedenen Versuchen bemerken wird. Die Temperatur stieg gelegentlich auf 20° C oder darüber, fiel in anderen Fällen auf 10°. Die Konzentrationsgrenzen für die Entgiftung sind aber anscheinend gar nicht oder nur unbedeutend hierdurch beeinflußt worden. Um sicher zu gehen, vergleichen wir immer nur solche Versuchsreihen untereinander, die gleichzeitig angestellt waren. In solchen Versuchen ist das Material und die Temperaturvariation identisch.

Während der Versuchsdauer wurden die Fische nicht gefüttert.

Das destillierte Wasser wurde im Laboratorium mit allen Kautelen in Glas hergestellt und auf das sorgfältigste auf seine Reaktion geprüft.

2. Die relative Giftigkeit der einzelnen Bestandteile des Seewassers.

Soviel ich weiß, hat noch niemand die relative Giftigkeit der einzelnen Bestandteile des Seewassers für Seetiere unter-

sucht. Eine solche Untersuchung läßt sich nämlich nur an solchen Seetieren durchführen, die, wie Fundulus, vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig sind. Das Seewasser ist nach van't Hoff ein Gemisch von folgender molekularer Zusammensetzung: 100 Moleküle NaCl, 2,2 KCl, 1 bis 2 $CaCl_2$, 7,8 $MgCl_2$, 3,8 $MgSO_4$. Von den Phosphaten und Carbonaten sehen wir zunächst ab. Meine Versuche in Californien und neuerdings in Woods Hole haben ergeben, daß wir die optimale Konzentration für eine künstliche Lösung für Seetiere erhalten, wenn wir die Salzlösungen alle in halbmolekularer Konzentration anwenden.

Ich stellte nun folgende 5 Lösungen her:

1. 100 ccm $^m/_2$ NaCl,
2. 2,2 „ „ KCl + 97,8 destilliertes Wasser,
3. 2,0 „ „ $CaCl_2$ + 98 „ „
4. 7,8 „ „ $MgCl_2$ + 92,2 „ „
5. 7,8 „ „ „ + 3,8 ccm $^m/_2$ $MgSO_4$ + 88,4 ccm dest. Wasser.

In jede der Lösungen wurden 6 Fundulus gebracht. In Lösung 3, 4 und 5 lebten die Fische beliebig lange, d. h. mehr als 4 Wochen — dann wurden die Versuche unterbrochen. In Lösung 1 und 2 starben die Fische in wenigen Tagen, in der Kaliumchloridlösung rascher als in der Chlornatriumlösung. Die niedrige Konzentration der KCl-Lösung war nicht für das Resultat verantwortlich, denn in einer NaCl-Lösung von demselbem osmotischen Drucke — z. B. $^m/_{100}$ NaCl — leben die Fische beliebig lange, desgleichen in einer $^m/_{100}$ $CaCl_2$ oder $^m/_{100}$ $MgCl_2$-Lösung.

Dieses Resultat ist von Interesse, weil es zeigt, daß die im Seewasser enthaltenen Chloride mit einwertigem Metall in der Konzentration, in der sie im Seewasser enthalten sind, giftig sind,[1]) während die mit zweiwertigem Metall ungiftig sind. Ob das gleiche auch für $MgSO_4$ gilt, habe ich noch nicht untersucht.

[1]) Diese Tatsache war für NaCl schon vor 10 Jahren gefunden worden. KCl ist spezifisch giftig für Organismen mit Nerven und Muskeln. Für den ersten Tag der Entwicklung des Fundulusembryo ist KCl kaum giftiger als NaCl, es wird aber giftiger, sobald die Herztätigkeit und die Zirkulation im Embryo eintreten. Das habe ich in meinen früheren Arbeiten diskutiert.

3. Die untere Konzentration für die Giftigkeit von KCl.

Es war eine Überraschung für mich, zu finden, daß das KCl in der Konzentration, in der es im Seewasser vorhanden ist (2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung) ein rasch tödliches Gift für Fundulus ist. Diese Giftwirkung bleibt uns gewöhnlich verborgen, weil die anderen Bestandteile des Seewassers diese giftige Wirkung aufheben. Was für Fundulus gilt, dürfte wohl auch für viele, wenn nicht alle anderen Seetiere zutreffen. Wir können das aber leider nicht prüfen, weil nur wenige Seetiere vom osmotischen Druck der umgebenden Lösung genügend unabhängig sind, um die Versuche anzustellen, die wir eben für Fundulus erwähnt haben.

Es wurden nun Versuche angestellt, um die untere Grenze für die Giftigkeit einer KCl-Lösung zu ermitteln. Der folgende Versuch deutet die Zunahme der Giftigkeit mit der Konzentration an. Je 6 Fische wurden in jede Lösung gebracht und die Zahl der überlebenden Fische in jeder Lösung täglich festgestellt.

Tabelle I.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,25 ccm $^m/_2$ KCl	0,55 ccm $^m/_2$ KCl	1,1 ccm $^m/_2$ KCl	2,2 ccm $^m/_2$ KCl	3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung
1	6	6	5	3	2
2	6	6	5	3	0
3	6	6	1	2	
4	6	6	0	0	
5	6	6			
6	6	6			
7	6	6			
8	6	6			
9	6	6			
10	6	6			

Es war für die Zwecke dieser Untersuchung nötig, auch andere Kaliumsalze neben KCl in Betracht zu ziehen; es wurden K_2SO_4 und essigsaures Kalium gewählt. Nach Overton sollen diese Salze für den Froschmuskel ungiftig sein. Ehe Overton die Muskeln in die Lösungen dieser Salze brachte, befreite er sie erst von dem an der Oberfläche etwa haftenden NaCl, in dem er sie 6 Stunden in eine Zuckerlösung brachte. Ich wusch die Fische, die in die Lösungen von K_2SO_4 gebracht

wurden, erst 4 Stunden in Süßwasser, das 2mal gewechselt wurde, und dann 2 Stunden in einer $^m/_{100}$ Na_2SO_4-Lösung (Kahlbaums „Zur Analyse"). Es stellte sich heraus, daß eine Lösung von K_2SO_4 2mal so giftig ist wie eine äquimolekulare Lösung von KCl. Die Tabelle II mag als Beispiel dienen.

Tabelle II.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,25 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 in 100 ccm der Lös.	0,55	1,1	1,65 in H_2O
1	6	4	4	2
2	6	0	0	0
3	5			
4	5			
5	5			
6	5			
7	5			
8	4			
9	4			
10	4			

Eine Lösung von 0,25 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 ist ebenso wirksam wie die von 0,55 ccm $^m/_2$ KCl in der Tabelle I. Was die Wirkung von essigsaurem Kalium anbetrifft, so ist seine Giftigkeit von derselben Größenordnung oder etwas größer als die einer äquimolekularen Lösung von KCl. Die Tabelle III kann als Beispiel gelten. Die Fische waren 4 Stunden in Süßwasser, dann 2 Stunden in $^m/_{100}$ Na-Acetat gewaschen worden, ehe sie in die Lösungen von KCl gebracht wurden.

Tabelle III.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,25 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium	0,55	1,1	2,2	3,3 in 100 ccm der Lösung in H_2O
1	6	6	6	3	3
2	5	3	0	0	0
3	5	3			
4	5	3			
5	5	3			
6	5	3			
7	5	3			
8	5	3			
9	5	3			
10	5	3			

Im allgemeinen wurden die Lösungen mit essigsaurem Kalium rasch trübe, eine Erscheinung, die bei allen Lösungen

mit organischen Stoffen beobachtet wurde. Vermutlich waren Bakterien oder sonstige Nebenbedingungen hier von Einfluß.

Es ist auch noch nötig, zu erwähnen, daß die Versuche der Tabellen I, II und III gleichzeitig angestellt wurden, so daß die Temperaturverhältnisse für diese 3 Versuche identisch waren.

4. Die Giftigkeit von Lösungen von verschiedenen Natriumsalzen.

Im Jahre 1899 machte ich darauf aufmerksam, daß das im Seewasser und im Serum enthaltene K und Ca nicht direkt für die Tiere nötig sei, sondern nur zur Entgiftung des NaCl diene, das in höheren Konzentrationen giftig sei. Diese Tatsache wird auch bei den Versuchen an den halb ausgewachsenen Fundulus wieder bemerkbar. Da in den Versuchen dieser Arbeit NaCl zur Entgiftung benutzt wird, war es nötig, die Grenzen der Giftigkeit von reinen NaCl-Lösungen für diese Fische genauer kennen zu lernen.

Tabelle IV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in				
	$^m/_{100}$	$^m/_{20}$	$^m/_8$	$^m/_4$	$^m/_2$ NaCl
2	6	6	6	6	3
3	6	6	6	3	0
4	6	6	6	2	
5	6	6	6	2	
6	6	6	6	2	
7	6	6	6	2	
10	6	5	6	1	
15	5	5	6	1	

Das ist ein Beispiel eines günstigen Versuches. Im allgemeinen starben die Fische in Lösungen, die konzentrierter waren als $^m/_4$ in kurzer Zeit, während sie in Lösungen von $^m/_8$ und darunter beliebig lange am Leben blieben. Der Zusatz von Ca und K zur NaCl-Lösung wird bei Fundulus erst nötig, wenn die NaCl-Lösung eine höhere Konzentration besitzt als $^m/_8$, also höher ist als ein Viertel der normalen Konzentration.

Die Lösungen von Na_2SO_4 sind viel giftiger als die Lösungen von NaCl. Eine $^m/_8$ Na_2SO_4-Lösung ist giftiger als eine $^m/_4$ NaCl-Lösung. In einer $^m/_{16}$ Lösung von Na_2SO_4 konnten die Fische etwa 10 Tage leben, also nicht so lange wie in einer $^m/_8$ Lösung von NaCl. Das rührt wohl daher, daß eine so konzentrierte

Lösung von Na_2SO_4 das Ca an der Oberfläche des Tieres zum Teil fällen muß.

Eine $^m/_{16}$ Lösung von Na_2SO_4 ist wenigstens so weit ungiftig, daß sie als entgiftende Lösung benutzt werden kann. $^m/_{50}$ und $^m/_{100}$ Lösungen von Na_2SO_4 waren praktisch harmlos für die Fische, die in solchen Lösungen lange leben konnten.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß die bei diesen Versuchen gebrauchten Salze die reinsten Kahlbaumschen Präparate, im Falle von NaCl und Na_2SO_4 die mit der Marke „Zur Analyse" versehenen Salze waren.

5. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten von KCl durch NaCl für mittlere Konzentration von KCl.

Ich fand sehr bald, daß eine NaCl-Lösung imstande ist, eine Lösung von KCl zu entgiften, und daß sich die Grenzkonzentration des NaCl, bei der diese Entgiftung eintritt, scharf bestimmen läßt. Als Beispiel diene einer meiner ersten Versuche in dieser Richtung. 2,2 ccm $^m/_2$ KCl waren in je 100 ccm der folgenden Lösungen von NaCl gelöst: $^m/_{100}$, $^m/_{20}$, $^m/_8$, $^m/_4$, $^3m/_8$, $^m/_2$. In jede Lösung wurden je 6 Fundulus gebracht und jeden Tag die Zahl der überlebenden Fische festgestellt.

Tabelle V.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm						
	H_2O	$^m/_{100}$	$^m/_{20}$	$^m/_8$	$^m/_4$	$^{3m}/_8$	$^m/_2$ NaCl
1	2	1	3	4	6	6	6
2	0	0	0	0	6	5	6
3					6	4	6
4					5	3	5
5					5	3	4
6					5	3	1
7					5	3	0
14					4	3	

Man sieht, daß eine $^m/_8$ Lösung von NaCl noch völlig außerstande ist, die KCl-Lösung zu entgiften, während die Entgiftung in der $^m/_4$ Lösung vollständig ist.

Es wurde bei der Wiederholung desselben Versuches mit 2,2 ccm $^m/_2$ KCl gefunden, daß die entgiftende Konzentration des NaCl wie in diesem Versuche zwischen $^m/_8$ und $^m/_4$ liegt. Das führte naturgemäß zur Frage, ob die zur Entgiftung nötige

Konzentration des NaCl sich mit der Konzentration des KCl ändert. Die folgenden 3 Versuchsreihen mit 1,1 und 2,2 und 4,4 ccm KCl in 100 ccm der Lösung wurden gleichzeitig zum Vergleich angestellt.

Tabelle VI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm m/2 KCl pro 100 ccm						
	m/100	m/16	m/8	3m/16	m/4	3m/8	m/2 NaCl
1	5	6	6	5	6	6	6
2	3	4	6	5	6	6	5
3	0	2	6	4	6	5	4
4		1	6	4	5	5	4
5		0	6	4	5	5	4
6			4	3	5	4	4
7			4	3	5	3	4
8			4	3	5	3	4
9			4	3	5	3	4
16			4	3	5	2	0

Tabelle VII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm m/2 KCl pro 100 ccm						
	m/100	m/16	m/8	3m/16	m/4	3m/8	m/2 NaCl
1	4	6	6	6	6	6	6
2	1	1	3	6	6	6	4
3	0	0	0	5	6	5	4
4				2	5	5	2
5				1	4	4	2
6				1	4	4	2
7				1	4	4	1
14				1	4	2	1
21				0	4	1	1

Tabelle VIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 4,4 ccm m/2 KCl pro 100 ccm					
	m/16	m/8	3m/16	m/4	3m/8	m/2 NaCl
1	5	5	2	5	7	6
2	0	0	0	2	7	1
3				0	5	1
4					4	1
5					3	1
6					3	1
7					3	1
8					1	1
9					1	1
10					1	1
11					0	1

Vergleicht man diese 3 Tabellen, so fallen die folgenden Tatsachen auf, erstens, daß die Grenzkonzentration, bei der die entgiftende Wirkung des NaCl auftritt, eine scharfe ist, und daß diese Konzentration anscheinend direkt proportional der Konzentration des KCl ist, nämlich für

1,1 ccm KCl zwischen $^{m}/_{16}$ und $^{m}/_{8}$ NaCl,
2,2 „ „ bei $^{3}/_{16}$ m NaCl,
4,4 „ „ „ $^{3}/_{8}$ „ „

liegt. Spätere Versuche zeigten, daß die entgiftende Wirkung von 1,1 ccm KCl gewöhnlich eintritt, wenn C_{NaCl} ungefähr $^{3\,m}/_{32}$ ist. Ein dritter Umstand, der zu beachten ist, ist die Tatsache, daß bei 4,4 KCl die Entgiftung nicht mehr so vollständig ist wie bei 2,2 oder 1,1 KCl; d. h. die Zahl der überlebenden Tiere ist bei 4,4 KCl auch bei maximaler Entgiftung kleiner als bei 2,2 KCl.

Wir wollen nun, ehe wir weiter gehen, einen neuen Begriff einführen, der für das Gebiet der antagonistischen Salzwirkungen wichtig ist, nämlich den des Entgiftungskoeffizienten. Darunter verstehen wir den Wert des Verhältnisses der Konzentration des giftigen zu der des entgiftenden Salzes, die zur Entgiftung gerade ausreicht. Die wesentliche Aufgabe war nun, diesen Koeffizienten für KCl und NaCl genauer zu bestimmen, als das in den vorhin erwähnten Versuchen geschah. Zu dem Zweck wurden Versuche angestellt, in denen das Konzentrationsintervall von NaCl $^{m}/_{32}$ war. Es wurde der Entgiftungskoeffizient für 5 verschiedene Konzentrationen von KCl bestimmt. Die Tabellen sollen in extenso mitgeteilt werden.

Tabelle IX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^{m}/_{2}$ KCl pro 100 ccm			
	$^{2}/_{32}$	$^{3}/_{32}$	$^{4}/_{32}$	$^{5}/_{32}$ m NaCl
2	5	6	6	6
3	1	6	6	6
4	0	6	6	6
5		1	6	6
6		0	6	6
7			6	6
8			6	4
9			6	4
14			6	4

Die Lösungen, die in diesen Abhandlungen erwähnt sind, waren stets so gewählt, daß die betreffende Menge des giftigen Salzes in 100 ccm der Lösung enthalten war. 2,2 ccm $^m/_2$ KCl waren also beispielsweise stets in 100 ccm der entgiftenden Lösung enthalten.

Tabelle X.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm				
	$^3/_{32}$	$^4/_{32}$	$^5/_{32}$	$^6/_{32}$	$^7/_{32}$ m NaCl
2	4	5	6	7	7
3	0	0	6	7	7
4			2	7	7
5			2	7	7
6			1	7	7
7			1	7	7
8			1	7	7
9			0	6	7
14				2	3

Tabelle XI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm				
	$^5/_{32}$	$^6/_{32}$	$^7/_{32}$	$^8/_{32}$	$^9/_{32}$ m NaCl
2	6	6	6	6	6
3	0	5	6	5	6
4		4	6	5	6
5		3	6	5	6
6		2	5	5	6
7		2	5	5	6
8		2	5	5	6
9		1	4	4	6
14		1	0	2	3

Tabelle XII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,75 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm				
	$^6/_{32}$	$^7/_{32}$	$^8/_{32}$	$^9/_{32}$	$^{10}/_{32}$ m NaCl
2	4	6	6	6	6
3	0	5	6	6	6
4		2	4	6	6
5		2	4	5	5
6		2	4	5	4
7		2	4	5	4
8		2	4	5	4
9		2	3	5	3
14		2	0	1	1

Tabelle XIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm					
	$^7/_{32}$	$^8/_{32}$	$^9/_{32}$	$^{10}/_{32}$	$^{11}/_{32}$	$^{12}/_{32}$ m NaCl
2	6	6	6	6	6	7
3	1	4	5	4	5	7
4	0	1	5	2	5	7
5		0	2	2	5	7
6			2	2	4	6
7			2	2	4	5
8			2	1	4	5
9			2	1	4	5
14			0	1	2	5

Bestimmen wir nun den Entgiftungskoeffizienten für KCl durch NaCl, so haben wir in diesen Versuchen folgende Daten.

Tabelle XIV.

	Entgiftungs-Koeffizient C_{KCl}/C_{NaCl}
1,1 ccm $^m/_2$ KCl entgiftet durch 100 ccm $^3/_{32}$ m NaCl[1])	$^1/_{17}$—$^1/_{20}$
1,65 „ „ „ „ „ 100 „ $^5/_{32}$ „ „	$^1/_{19}$
2,2 „ „ „ „ „ 100 „ $^6/_{32}$ „ „	$^1/_{17}$
2,75 „ „ „ „ „ 100 „ $^7/_{32}$ „ „	$^1/_{16}$
3,5 „ „ „ „ „ 100 „ $^9/_{32}$ „ „	$^1/_{17}$

Der Entgiftungskoeffizient C_{KCl}/C_{NaCl} ist also praktisch konstant, und zwar im Durchschnitt $^1/_{17}$. Die Einzelwerte schwanken nur wenig um diesen Wert. Diese Schwankungen könnten dadurch bedingt sein, daß die Konzentrationsintervalle für NaCl nicht klein genug gewählt waren, oder daß sie in den Grenzen der Genauigkeit dieser Versuche liegen. Es wurde eine Versuchsreihe mit 1,1 ccm $^m/_2$ KCl und 1,65 ccm $^m/_2$ KCl angestellt, in denen das Konzentrationsintervall der entgiftenden NaCl-Lösung $^m/_{100}$ resp. $^m/_{50}$ betrug. Das Resultat ist in den Tabellen XV und XVI wiedergegeben.

Der Entgiftungskoeffizient ist $^1/_{18}$ resp. $^1/_{19}$. In einem analogen Versuch bestimmte ich den Entgiftungskoeffizienten für 2,2 ccm und 2,75 ccm $^m/_2$ KCl, ebenfalls für Intervalle von $^m/_{100}$ von NaCl. Der Entgiftungskoeffizient für 2,2 ccm KCl betrug $^1/_{18}$, der für 2,75 ccm $^1/_{16}$. Wir kommen also zu dem Schluß, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl

[1]) Der wirkliche Wert liegt ein wenig über $^3/_{32}$ m.

durch NaCl praktisch konstant ist und nur wenig vom Werte $^1/_{17}$ abweicht, solange die Konzentration von KCl zwischen 1,1 und 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung beträgt.

Tabelle XV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm											
	$^m/_{100}$	$^{2m}/_{100}$	$^{3m}/_{100}$	$^{4m}/_{100}$	$^{5m}/_{100}$	$^{6m}/_{100}$	$^{7m}/_{100}$	$^{8m}/_{100}$	$^{9m}/_{100}$	$^{10m}/_{100}$	$^{11m}/_{100}$	$^{12m}/_{100}$
2	1	1	2	1	1	3	3	5	5	6	6	6
3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	6	6
4								0	1	5	5	5
5										5	5	5
6										5	5	5
7										5	5	5
10										5	5	5

Tabelle XVI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm								
	$^m/_{100}$	$^{2m}/_{100}$	$^{4m}/_{100}$	$^{6m}/_{100}$	$^{8m}/_{100}$	$^{10m}/_{100}$	$^{12m}/_{100}$	$^{14m}/_{400}$	$^{16m}/_{100}$
2	2	1	1	0	1	4	5	5	6
3	0	0	0	0	0	0	1	3	5
4							0	0	5
5									4
6									2
7									2
10									2

Da im Seewasser und anscheinend auch in der optimalen Durchspülungsflüssigkeit für das Herz das Konzentrationsverhältnis $KCl : NaCl = \frac{2,2}{100}$, also angenähert $= {}^1/_{45}$ ist, so sieht man, daß für eine vollständige Entgiftung hier gesorgt ist, auch wenn man von der entgiftenden Wirkung des Ca absieht.

6. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten für niedrigere Konzentrationen von KCl.

Die Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten von KCl durch NaCl für niedrige Konzentrationen von KCl bietet eine Schwierigkeit, die dadurch bedingt ist, daß in solchen Konzentrationen das KCl wenig giftig ist. Gleichwohl kommt man zum Ziele. Eine Reihe von Tabellen wird das klar machen.

Tabelle XVII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,6 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	3	5	6	5	6	6	6
3	2	2	4	5	5	6	6
4	2	2	2	5	5	6	6
5	2	2	2	5	5	5	6
6	2	2	2	5	5	5	6
7	2	1	2	4	5	5	6
8	2	1	2	4	5	5	6
9	2	1	2	4	5	5	6

In der $^m/_{64}$ und $^m/_{32}$ Lösung von NaCl sind die Resultate nicht besser als in der Lösung von 0,6 ccm $^m/_2$ KCl in destilliertem Wasser. In der $^3/_{64}$ m Lösung von NaCl und in den höheren Konzentrationen von NaCl aber tritt das normale Verhalten der Fische ein, das für die durch NaCl völlig oder nahezu entgiftete Lösung von KCl charakteristisch ist. Wir dürfen also sagen, daß die volle Entgiftung einer Lösung von 0,6 ccm KCl durch NaCl bei $^3/_{64}$ m NaCl liegt.

Zur Bestätigung des Gesagten soll die Tabelle XVIII dienen, in der 0,7 ccm KCl zur Vergiftung benützt wurden. Der Versuch war mit dem vorigen gleichzeitig — also mit dem gleichen Material und bei der gleichen Temperatur — angestellt.

Tabelle XVIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	6	5	5	6	6	6	6
3	4	1	2	4	6	6	6
4	3	0	1	2	5	6	6
5	3		1	1	4	6	6
6	3		1	1	4	6	6
7	2		1	1	4	6	6
8	2		1	1	4	6	6
9	2		1	1	4	6	6

In diesem Falle läßt sich mit völliger Sicherheit behaupten, daß 0,7 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm einer $^1/_{64}$ bis $^3/_{64}$ m Lösung von NaCl giftiger, resp. mindestens ebenso giftig ist wie in 100 ccm destilliertem Wasser, daß aber in Lösungen von $^4/_{64}$ m oder mehr NaCl, Entgiftung eintritt.

Nach dem Gesagten sind die folgenden Tabellen, die Versuche mit 0,9 und 1,0 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung wiedergeben, ohne weiteres verständlich. Die Versuche sind gleichzeitig mit denen in Tabelle XVII und XVIII angestellt.

Tabelle XIX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,9 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	3	4	2	6	5	6	6
3	2	0	2	3	3	6	6
4	2		1	1	3	5	5
5	2		1	1	2	5	4
6	1		1	1	2	5	4
7	1		1	1	2	5	4
8	0		1	1	2	5	4
9			1	1	2	5	3

Tabelle XX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,0 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	3	3	3	3	6	6	6
3	3	0	0	2	4	3	6
4	1	0	0	0	0	2	6
5	0					1	5
6						1	5
7						1	5
8						1	5
9						1	5

Während die zur Entgiftung von 0,9 $^m/_2$ KCl nötige Konzentration von NaCl $^5/_{64}$ m ist, liegt sie für 1,0 KCl etwas unter, aber nahe bei $^6/_{64}$ m NaCl. Für 1,1 m KCl lag sie in diesem Versuche etwas über $^6/_{64}$ m NaCl. Wir erhalten also nach dieser Versuchsreihe die folgenden Entgiftungskoeffizienten.

Tabelle XXI.

						Entgiftungskoeffizient
0,6 ccm	$^m/_2$	KCl	entgiftet in 100 ccm	$^3/_{64}$	m NaCl	$^1/_{16}$
0,7 „	„	„	„ „ 100 „	$^4/_{64}$	„ „	$^1/_{18}$
0,9 „	„	„	„ „ 100 „	$^5/_{64}$	„ „	$^1/_{17}$
1,0 „	„	„	„ „ 100 „	$^5/_{64}$—$^6/_{64}$	„ „	$^1/_{16}$—$^1/_{19}$
1,1 „	„	„	„ „ 100 „	$^6/_{64}$	„ „	$^1/_{17}$

Man sieht also, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl durch NaCl auch für niedrige Konzentrationen von KCl angenähert $^1/_{17}$ beträgt, also konstant bleibt. Nebenbei soll hier ein Resultat vorläufig mitgeteilt werden, auf das wir in einer späteren Abhandlung zurückkommen werden, nämlich daß sehr niedrige Konzentrationen von NaCl nicht nur nicht entgiftend, sondern im Gegenteil sensibilisierend für die Giftigkeit des Kaliums wirken. Die Tabellen XVIII bis XX zeigen das sehr deutlich.

7. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten für KCl-Lösungen von höheren Konzentrationen.

Die bisherigen Versuche erstreckten sich auf Konzentrationen von 0,6 bis 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung. Lassen sich auch KCl-Lösungen von höherer Konzentration durch NaCl entgiften und bleibt der Entgiftungskoeffizient konstant? Der Grund, daß diese Frage gesondert behandelt wird, liegt darin, daß für höhere Konzentrationen von KCl die Entgiftung unvollständig ist, d. h. daß nicht alle Tiere oder die Mehrzahl derselben, sondern meist nur ein bis zwei Tiere lange überleben.

In Vorversuchen wurde festgestellt, wieviel KCl überhaupt durch NaCl entgiftet werden kann. Es stellte sich heraus, daß die oberste Grenze etwa bei 6,6 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung liegt. Auf diesen Grenzwert komme ich in einer späteren Arbeit zurück.

Nimmt man die Intervalle von NaCl größer als $^m/_{32}$, so findet man ungefähr dieselben Entgiftungskoeffizienten wie bei den niedrigeren Konzentrationen. In einem Versuche wurden folgende Resultate gefunden:

2,2	ccm	$^m/_2$	Kaliumacetat	wurden	entgiftet	in	100	ccm	$^3/_{16}$	m	NaCl
4,4	„	„	„	„	„	„	100	„	$^3/_8$	„	„
6,6	„	„	„	„	„	„	100	„	$^m/_2$—$^5/_8$		„

In diesem Versuche waren die Grenzkonzentrationen etwas schärfer, als das sonst bei diesen hohen Konzentrationen von KCl der Fall ist.

Zur Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten wurden nun Versuchsreihen mit kleineren Konzentrationsintervallen angestellt. Um das Tabellenmaterial in dieser Abhandlung nicht

allzusehr zu häufen, seien nur die Resultate mitgeteilt. In einer Versuchsreihe wurde die Entgiftungskonzentration von NaCl für 4,4, 4,95 und 5,5 $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung festgestellt. Das Konzentrationsintervall für NaCl betrug $^m/_{32}$. Die folgende Tabelle gibt das Resultat.

Tabelle XXII.

										Entgiftungskoeffizient
4,4 ccm	$^m/_2$	KCl	entgiftet	in	100 ccm	$^{11}/_{32}$	m	NaCl		$^1/_{16}$
4,95 „	„	„	„	„	100 „	$^{12}/_{32}$	„	„		$^1/_{15}$
5,5 „	„	„	„	„	100 „	$^{13}/_{32}$	„	„		$^1/_{15}$

In einem zweiten Versuche war das Intervall der Konzentration des NaCl ebenfalls $^m/_{32}$.

Tabelle XXIII.

											Entgiftungskoeffizient
3,3 ccm	$^m/_2$	KCl	wurden	entgiftet	durch	100 ccm	$^9/_{32}$	m	NaCl		$^1/_{17}$
4,4 „	„	„	„	„	„	100 „	$^{11}/_{32}$	„	„		$^1/_{16}$
5,5 „	„	„	„	„	„	100 „	$^{13}/_{32}$	„	„		$^1/_{15}$

Es scheint also, daß der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$ für 4,4 ccm bis 5,5 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung $^1/_{16}$ bis $^1/_{15}$ ist. Es findet also, wenn überhaupt, nur eine geringe Zunahme des Wertes des Koeffizienten an der oberen Grenze statt.

8. Versuche mit nicht gemeinsamem Anion.

In allen bisher erwähnten Versuchen hatten das giftige und entgiftende Salz ein gemeinsames Anion. Es wurde festgestellt, daß hierdurch der Entgiftungskoeffizient nicht beeinflußt wird. Die folgenden Versuche sollen als Beispiel dienen.

0,5 ccm	$^m/_2$	K_2SO_4	wurden	entgiftet	in	100 ccm	$^m/_8$	NaCl		
1,1 „	„	„	„	„	„	„ 100 „	$^m/_4$	„		
2,2 „	„	„	„	„	„	„ 100 „	$^3/_8$	„		

Berücksichtigt man, daß für die Giftwirkung die K-Ionen und nicht die K_2SO_4-Moleküle in Betracht kommen, so sieht man, daß die Werte für den Entgiftungskoeffizienten identisch sind mit dem für KCl gefundenen.

Ferner sei das Resultat einer Versuchsreihe mit essigsaurem Kalium als giftiger und NaCl als entgiftender Lösung angeführt (Konzentrations-Intervallen von NaCl $^m/_{32}$).

Tabelle XXIV.

	Entgiftungskoeffizient
1,1 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet in 100 ccm $^3/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$
1,65 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet in 100 ccm $^5/_{32}$ m NaCl	$^1/_{19}$
2,2 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet in 100 ccm $^6/_{32}$—$^7/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$—$^1/_{20}$
3,3 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet in 100 ccm $^9/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$

Das gemeinsame Anion in den Versuchen mit KCl beeinflußte also den Wert des Entgiftungskoeffizienten nicht wesentlich.

II. Wird K durch das gleichsinnige oder das entgegengesetzt geladene Ion des antagonistischen Salzes entgiftet?

Die Tatsache, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl durch Natriumsalze nahezu konstant ist, erinnert an das Verteilungsgesetz, und es liegt nahe anzunehmen, daß es sich bei der Entgiftung von KCl durch Natriumsalze im Grunde darum handelt, daß sich die beiden Metalle K und Na auf ein gemeinsames, an der Oberfläche des Fisches enthaltenes Anion verteilen. Diese Annahme steht im Einklang mit der von mir vor 12 Jahren ausgesprochenen Hypothese, daß die Bedeutung der drei Metalle Na, K und Ca für die Erhaltung des Lebens darin liegt, daß dieselben mit demselben Bestandteil — vermutlich einem Eiweißkörper — eine Verbindung bilden,[1]) aus der sie sich gegenseitig nach dem Massenwirkungsgesetz verdrängen können. Nur dann sei der Ablauf des Lebens in der Zelle möglich, wenn die drei Metalle sich mit dem gemeinsamen, vermutlich kolloidalen Anion des lebenden Organismus in dem Verhältnis verbinden, wie es das Massenwirkungsgesetz und die relative Konzentration der drei Ionen im Seewasser resp. Serum bedingen.

Alle diese Annahmen aber verlangen den Nachweis, daß bei der Entgiftung von KCl durch NaCl der Antagonismus zwischen den gleichsinnig geladenen Ionen K und Na und nicht zwischen den entgegengesetzt geladenen Ionen K und Cl

[1]) Der Gedanke, daß Ionen sich mit Eiweißkörper verbinden, war unabhängig von mir auch von Wolfgang Pauli ausgesprochen worden.

besteht. Dieser Nachweis ist noch nicht erbracht. Wenn eine $^5/_8$ m Lösung von NaCl durch eine 2000mal geringere Konzentration von $CaCl_2$ entgiftet wird, so besteht kaum ein Zweifel, daß Ca das entgiftende Ion ist. Ob aber Na oder Cl das giftige Ion ist, ist nicht klar. Tatsächlich vertreten A. P. Mathews und W. Koch[1]) und vielleicht auch andere heute noch die Ansicht, daß in diesen und ähnlichen Fällen der Antagonismus immer zwischen den entgegengesetzt geladenen Ionen besteht, daß also, wenn Na das entgiftende, Cl das giftige Ion ist.

Es schien mir nun, daß es möglich sei, eine Entscheidung zwischen den hier bestehenden Möglichkeiten herbeizuführen. Wir wissen, daß die giftige Wirkung der Kaliumsalze in diesen Versuchen vom Kaliumion und nicht vom Anion Cl ausgeht, da die Fische in den Lösungen von NaCl, $CaCl_2$ oder $MgCl_2$ von der Konzentration, in der das KCl allein tödlich ist, beliebig lange leben. Es ist nur zweifelhaft, ob die entgiftende Wirkung des NaCl vom Na-Ion oder vom Cl-Ion ausgeht. Der Umstand, daß der Entgiftungskoeffizient KCl/NaCl nahezu eine Konstante ist, erlaubt die Frage zu beantworten, wenn wir als entgiftendes Salz ein Salz mit zweiwertigem Anion, z. B. Na_2SO_4, anwenden. Wird das K-Ion durch das Na-Ion entgiftet, so muß eine genau halb so große Konzentration von Na_2SO_4 zur Entgiftung von KCl ausreichen, wie sie im Falle von NaCl nötig ist.

Geht dagegen die antagonistische Wirkung vom Anion aus, so ist zu erwarten, daß die Hardy-Whethamsche Regel zutrifft, nämlich, daß die Wirkung eines Ions eine exponentielle Funktion seiner Wertigkeit ist. Meine früheren Versuche über die Entgiftung von Lösungen von Salzen mit einwertigem Metall (NaCl, KCl, LiCl) durch Salze mit zweiwertigem Metall haben gezeigt, daß der Entgiftungskoeffizient, z. B. NaCl/$CaCl_2$, nicht nur kein echter Bruch, sondern sehr groß ist; für $^5/_8$ m NaCl war er ungefähr 2000[2]); während der Koeffizient für die Entgiftung einer $ZnSO_4$-Lösung durch NaCl wieder ein echter Bruch ist, nämlich etwa $^1/_{50}$[3]). (Der Entgiftungskoeffizient war damals nur für wenige Konzentrationen der giftigen Lösung

[1]) W. Koch, Hoppe-Seylers Zeitschr. 63, 432, 1909.
[2]) Loeb, Am. Journ. of Physiol. 6, 411, 1902.
[3]) Loeb und Gies, Arch. f. d. ges. Physiol. 93, 246, 1902.

bestimmt worden.) Wäre also im Falle der Entgiftung von KCl durch Na_2SO_4, SO_4 das entgiftende Ion, so sollte man erwarten, daß die entgiftende Wirkung von Na_2SO_4 nicht 2mal, sondern vielmal größer wäre als die von NaCl. Die Versuche ergeben aber fast ausnahmslos und mit großer Schärfe, daß die entgiftende Wirkung von Na_2SO_4 genau 2mal so groß ist wie die einer äquimolekularen Chlornatriumlösung.

Es wurde der Entgiftungskoeffizient für 0,7 ccm $^m/_2$ KCl mit NaCl und Na_2SO_4 ermittelt. Tabelle XXV und XXVI geben die Resultate.

Tabelle XXV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	1	4	6	6	6	6
3	0	1	5	6	6	6
4		0	1	6	6	6
5			0	6	6	6
6				6	6	6
7				6	6	5
8				6	6	5
9				6	6	5

Tabelle XXIV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm			
	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$ m Na_2SO_4
2	5	6	7	6
3	0	5	6	4
4		5	5	4
5		5	5	4
6		5	4	4
7		5	4	4
8		5	4	4
9		5	4	3

Die Entgiftungskonzentration ist im Falle von NaCl genau 2mal so hoch wie im Falle von Na_2SO_4, nämlich $^4/_{64}$ m für NaCl und $^2/_{64}$ m für Na_2SO_4. Der Entgiftungskoeffizient ist also in beiden Fällen der gleiche, wenn man Na als das entgiftende Ion ansieht. Man erhält nämlich alsdann in beiden Fällen den Wert $^1/_{18}$ (derselbe Wert, den wir für dieselbe Konzentration von KCl auch in den früheren Versuchen erhielten).

Bei der prinzipiellen Bedeutung des hier behandelten Problems war es nötig, eine größere Zahl von Bestimmungen zu machen. Bei diesen Versuchen war es nur möglich, mit niedrigen Konzentrationen zu arbeiten, weil Lösungen von Na_2SO_4 in Konzentrationen über $^m/_8$ oft schon zu giftig sind, um für diesen Zweck benutzt werden zu können.

Tabelle XXVII und XXVIII geben zwei gleichzeitig angestellte Versuche mit 1,1 und 1,65 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung. Man wird sich aus den vorausgehenden Tabellen erinnern, daß zur Entgiftung von 1,1 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung eine $^3/_{32}$ bis $^m/_8$ Lösung von NaCl und für die Entgiftung von 1,65 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm Lösung eine $^5/_{32}$ bis $^6/_{32}$ m Lösung von NaCl erforderlich war.

Tabelle XXVII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^m/_{100}$	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^3/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6
2	3	5	6	6	3	3
3	0	0	4	6	1	3
4			1	6	1	1
5			0	5	1	1
6				5	1	1
7				5	1	0
8				3	0	
9				2		
16				2		

Tabelle XXVIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^m/_{100}$	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^3/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	5	6	6	6	6	5
2	4	2	5	6	6	1
3	0	0	0	3	4	1
4				1	2	1
5				0	2	1
6					2	1
7					1	1
8					1	1
9					1	1
10					1	1
11					1	1
12					1	0
16					1	

Bestimmt man den Entgiftungskoeffizienten in diesen zwei Versuchen, unter der Annahme, daß K durch Na ent-

giftet wird, so erhält man nach Tabelle XXVII etwa den Wert $^1/_{18}$ (da die Entgiftungskonzentration zwischen $^m/_{24}$ und $^m/_{16}$ Na_2SO_4 liegt); und nach Tabelle XXVIII den Wert $^1/_{23}$.

In einem weiteren Versuche wurden die entgiftenden Konzentrationen von Na_2SO_4 für 1,1, 1,65 und 2,2 $^m/_2$ KCl, für Intervalle von $^m/_{100}$ Na_2SO_4 bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle XXIX, XXX und XXXI.

Tabelle XXIX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung						
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6
2	4	4	3	6	5	6	6
3	2	1	0	3	2	5	6
4	2	0		0	1	4	4
5	1				0	1	4
6	1					1	4
7	1					0	3
8	1					0	2

Tabelle XXX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in							
	H_2O	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$	$^8/_{100}$	$^9/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6	6
2	6	2	2	4	6	6	5	5
3	5	0	0	2	3	5	4	2
4	2			1	0	3	3	2
5	0			0		3	3	0
6						2	3	
7						2	3	
8						2	2	

Tabelle XXXI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in								
	H_2O	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$	$^8/_{100}$	$^9/_{100}$	$^{10}/_{100}$	$^{11}/_{100}$	$^{12}/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6	6	5
2	4	2	4	5	4	5	4	2	2
3	1	0	1	0	2	0	2	1	2
4	0		0		1		1	1	2
5					1		0	0	2
6					1				0
7					1				
8					0				

In diesen Versuchen ist die Entgiftungskonzentration von Na_2SO_4 für 1,1 ccm $^m/_2$ KCl $^6/_{100}$ m, für 1,65 $^m/_2$ KCl $^7/_{100}$ und für 2,2 ccm $^m/_2$ KCl $^8/_{100}$ Na_2SO_4. Berechnet man die Entgiftungskoeffizienten auf Grund dieser Werte unter der Annahme, daß Na das entgiftende Ion ist, so erhält man die folgenden Werte: $^1/_{22}$, $^1/_{17}$ und $^1/_{16}$, also nahezu dieselben Werte, die man bei der Entgiftung von KCl durch NaCl erhält.

Bei der Wichtigkeit des Gegenstandes seien noch einige weitere Tabellen mitgeteilt. In Tabelle XXXII waren 0,55 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 als giftiges und Na_2SO_4 als entgiftendes Salz benutzt.

Tabelle XXXII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,55 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 pro 100 ccm der Lösung in				
	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^3m/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	1	4	5	4	1
2	0	1	4	2	1
3		0	2	1	1
4			1	1	1
5			1	1	1
6			1	1	0
7			1	1	
8			1	1	
9			1	1	
15			1	1	

Sieht man K als das giftige, Na als das entgiftende Ion an, so erhält man als Entgiftungskoeffizienten $^1/_{32}$, wenn man $^m/_{16}$ als die Entgiftungskonzentration annimmt. Bei geringeren Konzentrationsintervallen von Na_2SO_4 würde der Koeffizient zweifellos etwas größer ausgefallen sein. Aber er liegt nahe genug an $^1/_{17}$, um als weitere Bestätigung zu dienen.

In Tabelle XXXIII und XXXIV handelt es sich wieder um die Entgiftung von 1,1 resp. 2,2 ccm $^m/_2$ KCl durch Na_2SO_4.

Zur Entgiftung von 2,2 ccm $^m/_2$ KCl war bereits eine Konzentration von Na_2SO_4 erforderlich, die über der toxischen Grenze dieses Salzes lag, so daß seine entgiftende Wirkung auf KCl dadurch verdeckt wurde. Die obere giftige Grenze für die toxische Wirkung von Na_2SO_4 (und übrigens auch für NaCl) schwankt etwas, und man erhielt gelegentlich Kulturen, die die zur Entgiftung von 2,2 ccm $^m/_2$ KCl (pro 100 ccm der Lösung) nötige Konzentration von Na_2SO_4 ertragen können. Die Tabelle XXXIV ist ein Beispiel hierfür.

Tabelle XXXIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in				
	$^m/_{100}$	$^m/_{200}$	$^m/_{16}$	$^m/_8$	$^3/_{16}$ m Na_2SO_4
1	6	6	5	1	0
2	4	5	4	0	
3	1	4	4		
4	0	0	4		
5			4		
6			3		
7			2		
8			2		
9			2		
10			1		
11			1		
12			1		
21			1		

Tabelle XXXIV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	$^m/_{100}$	$^m/_{50}$	$^m/_{16}$	$^m/_8$	$^3/_{16}$ m	$^m/_4$	$^3/_8$ m Na_2SO_4
1	5	5	6	5	2	2	0
2	3	2	3	5	1	0	
3	0	0	1	2	0		
4			0	1			
5				1			
6				1			
7				0			

Theoretisch sollte die entgiftende Konzentration etwa $^3/_{32}$ m Na_2SO_4 sein. Die Tabelle zeigt, daß der gefundene Wert zwischen $^3/_{32}$ und $^4/_{32}$ m Na_2SO_4 liegt. Wir können also sagen, daß bei der Entgiftung von KCl durch Na_2SO_4 der Entgiftungskoeffizient denselben Wert hat wie bei der Entgiftung von KCl durch NaCl, wenn man K als das giftige und Na als das entgiftende Ion ansieht. Der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$ ist also in Wirklichkeit der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_K}{C_{Na}}$, und die antagonistischen Ionen sind K und Na, also die Ionen mit gleicher Ladung.

Ich habe nun Versuche mit anderen Natriumsalzen mit 2 resp. 3wertigem Anion als entgiftenden Salzen angestellt,

nämlich oxalsaurem, bernsteinsaurem und citronensaurem Natrium. Alle drei Salze erwiesen sich aber als so giftig, daß sie für eine Entgiftung von KCl nicht zu gebrauchen waren.

III. Theoretische Erwägungen.

Bei der Klarheit der Resultate kann dieses Kapitel kurz ausfallen. Der nahezu konstante Wert des Entgiftungskoeffizienten $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$, sowie die Tatsache, daß die antagonistischen Ionen K und Na sind, legen die folgende Auffassung nahe. Der Fisch und die umgebende Lösung bilden ein 2phasiges System. Die Na- und K-Ionen der umgebenden Lösung konkurrieren um ein gemeinsames Anion, das in begrenzter Menge an der Oberfläche, oder (vielleicht wahrscheinlicher) an einem Teil der Oberfläche des Fisches (den Kiemen) vorhanden ist. Sobald mehr als $^1/_{17}$ der Anionen sich mit K verbinden können, d. h. sobald $\frac{C_K}{C_{Na}}$ in der umgebenden Lösung den Wert $^1/_{17}$ bis $^1/_{15}$ überschreitet, geht das Tier an Kaliumvergiftung zugrunde.

Das kann zwei Gründe haben. Entweder können die Kaliumionen nur in Verbindung mit einem bestimmten, in der Zelle gebildeten und an der Oberfläche vorhandenen organischen Anion, in die Zellen und von da ins Blut und in das Zentralnervensystem diffundieren; oder aber das Überschreiten des Wertes $\frac{C_K}{C_{Na}}$ über den des Entgiftungskoeffizienten ändert auf andere Weise die Durchgängigkeit der Oberflächenlamelle des Tieres für die K-Ionen oder Kaliumsalze.

Es wäre aber irrig, aus diesen Versuchen zu folgern, daß der Mechanismus der antagonistischen Salzwirkung in allen Fällen identisch sei; es ist möglich, daß es verschiedene Mechanismen der Entgiftung eines Salzes durch ein anderes gibt. Es ist die Aufgabe der folgenden Arbeiten, das zur Entscheidung dieser Frage nötige Material herbeizuschaffen.

IV. Zusammenfassung der Resultate.

1. Nach van't Hoff sind KCl und NaCl im Seewasser im Verhältnis von 2,2 Molekülen KCl zu 100 Molekülen NaCl

vorhanden. Es wird darauf hingewiesen, daß auf Grund der neueren Versuche Vernons dieser Wert $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}} = {}^1/_{45}$ auch das optimale Verhältnis für diese zwei Salze für die Erhaltung der Herztätigkeit bei der Schildkröte ist.

2. Versuche an einem marinen Fisch, Fundulus, der in weiten Grenzen vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig ist, haben ergeben, daß das KCl in der Konzentration, in der es im Seewasser vorhanden ist, die Fische in wenigen Tagen tötet, wenn es allein in der Lösung ist. Das gleiche gilt für das NaCl. Dagegen leben die Fische beliebig lange in reinen Lösungen von $CaCl_2$ und $MgCl_2$ von der Konzentration, in der diese Salze im Seewasser vorhanden sind.

3. Es wird gezeigt, daß eine giftige Konzentration von KCl durch Zusatz von NaCl entgiftet werden kann.

4. Der Begriff Entgiftungskoeffizient wird eingeführt. Unter Entgiftungskoeffizient versteht man das Verhältnis der Konzentration des giftigen zu derjenigen des antagonistischen Salzes, die eben zur Entgiftung der Lösung ausreicht.

5. Der Entgiftungskoeffizient von KCl durch NaCl wird für eine Reihe von Konzentrationen von KCl bestimmt, und es wird gefunden, daß derselbe einen nahezu konstanten Wert hat, nämlich ${}^1/_{17}$. Sobald der Wert $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}} > {}^1/_{17}$ oder ${}^1/_{16}$ wird, geht der Fisch an Kaliumvergiftung zugrunde.

6. Es gibt eine obere Grenze für die Konzentration von KCl, oberhalb welcher keine Entgiftung durch NaCl mehr möglich ist. Diese Grenze wird erreicht, wenn etwa 6,6 ccm ${}^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung vorhanden sind.

7. Für die höheren Konzentrationen von KCl, nämlich von 4,4 ccm ${}^m/_2$ KCl bis 5,5 oder 6,6 ccm ${}^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung ist der Entgiftungskoeffizient anscheinend ein wenig größer als ${}^1/_{17}$, nämlich ${}^1/_{16}$ bis ${}^1/_{15}$.

8. Wird Na_2SO_4 an der Stelle von NaCl zur Entgiftung von KCl angewendet, so zeigt es sich, daß die zur Entgiftung von KCl nötige Konzentration dieses Salzes genau halb so groß ist wie die erforderliche Konzentration von NaCl. Benutzt man als giftige Lösung K_2SO_4, so läßt sich zeigen, daß die

giftige Wirkung dieses Salzes genau zweimal so groß ist wie die einer äquimolekularen Menge von KCl.

9. Aus diesen Tatsachen wird der Schluß gezogen, daß die giftige Substanz in diesen Versuchen das Kaliumion und die antagonistische oder entgiftende das Natriumion ist, und daß der Antagonismus nicht zwischen den Ionen mit entgegengesetzter Ladung, sondern zwischen denen mit gleicher Ladung stattfindet.

10. Die sub 5 und 9 erwähnten Tatsachen und Schlüsse legen den Gedanken nahe, daß die Entgiftung von K durch Na dadurch zustande kommt, daß K und Na um dasselbe Anion der Oberfläche des Fisches (etwa der Kiemen) konkurrieren, wo dasselbe in begrenzter Menge vorhanden ist. Sobald mehr als $^1/_{17}$ resp. $^1/_{15}$ der Zahl dieser Anionen sich mit K verbinden, geht das Tier an Kaliumvergiftung zugrunde. Wie das möglich ist, wird im letzten theoretischen Abschnitt der Arbeit diskutiert.

11. Es wird erwähnt, daß sehr kleine, aber bestimmte Mengen von NaCl die giftige Wirkung von KCl erhöhen. Diese Tatsache soll in einer der nächsten Mitteilungen ausführlicher behandelt werden.

Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(*Eingegangen am 25. Februar 1911.*)

I.

Der Einfluß der Bernstein-, Citronen-, Apfel- und Fumarsäure auf die Atmung des isolierten Froschmuskels ist zuerst von Thunberg mit Hilfe seines Mikrorespirometers untersucht worden. Zu gleicher Zeit untersuchte Thunberg die Wirkung einer großen Anzahl von organischen Säuren.[1]) Er fand, daß unter den Di- und Tricarbonsäuren die einen den Gaswechsel stark herabsetzen (Oxalsäure, Maleinsäure u. a.), während die anderen eine geringere hemmende Wirkung ausüben. Die Bernstein-, Fumar-, Apfel- und Citronensäure hingegen steigern mehr oder weniger die Sauerstoffaufnahme. Während die Bernsteinsäure gleichzeitig die Kohlensäurebildung stark vermindert, bewirken die drei letzteren Säuren eine beträchtliche Steigerung der Kohlensäureabgabe.

In einer jüngst erschienenen Arbeit[2]) haben wir gezeigt, daß alle Tiergewebe die Fähigkeit besitzen, die Bernsteinsäure zu Apfelsäure zu oxydieren. Diese Oxydation der Bernsteinsäure weist die größte bisher in den Tiergeweben wahrgenommene Reaktionsgeschwindigkeit auf. Unter den Geweben sind die wirksamsten in der Beziehung die Muskeln, die Leber und die

[1]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. IV. Mitteilung. Skand. Arch. 24, 23, 1910.

[2]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. 30, 172, 1910.

Niere. Fügt man zu einem Gewebe, das noch die Hauptatmung besitzt, wie z. B. der Muskel, Bernsteinsäure hinzu, so tritt die Oxydation dieser Substanz zum großen Teil an Stelle der eigentlichen Atmung des Gewebes, und man erzielt auf diese Weise eine mehr oder weniger starke Steigerung der Sauerstoffaufnahme und zugleich eine Verminderung der Kohlensäurebildung. Nach Thunberg[1]) könnte die Wirkung der Bernsteinsäure durch die Annahme erklärt werden, „daß die normalen Oxydationsprozesse in der Weise ablaufen, daß ein Zwischenvorgang eingeschoben ist, wobei ein unbekannter Stoff in Bernsteinsäure und Kohlensäure, vielleicht auch in mehrere andere Stoffe zerfällt. Wenn Bernsteinsäure in größerer Menge vorhanden ist, wirkt sie auf diesen Prozeß zurückdrängend, dagegen nicht, wenigstens nicht primär, auf die anderen Oxydationsprozesse verhindernd. Die Sauerstoffaufnahme, die ein unabhängiger Teilprozeß ist, wird also nicht beeinflußt, nur die Kohlensäurebildung". Wir haben aber soeben gesagt, daß die spezifische Wirkung der Bernsteinsäure sich auf viel einfachere Weise erklärt.

Auf dem letzten Physiologenkongresse in Wien machte Thunberg im Laufe einer Diskussion die Mitteilung, daß er die Wirkung der eben genannten Säuren auf den Gasaustausch des durch Wasser extrahierten Froschmuskels, den wir als Muskelrückstand bezeichneten, untersucht hat. Die Versuchsergebnisse werden eingehend in einer demnächst (im Skand. Arch. f. Physiol.) erscheinenden Arbeit mitgeteilt werden. Verfasser hat uns liebenswürdig einen Korrekturabzug dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Thunberg findet, daß Zusatz von Bernsteinsäure zum Muskelrückstand die Sauerstoffaufnahme steigert, die Kohlensäureabgabe etwas vermindert, häufiger aber leicht steigert. Weiter findet Thunberg, daß die Apfel-, Fumar- und Citronensäure den Gasaustausch des Muskelrückstandes und namentlich die Kohlensäureabgabe steigern. Der Muskelrückstand verhält sich in der Beziehung wie der ganze Muskel. Er hebt besonders hervor, „daß die Eigenschaften, die Battelli und Stern für ihr Pnein gefunden haben, gar nicht ausschließen, daß es mit einer organischen Säure identisch ist". Wir werden aber sehen, daß die Wirkung des Pneins

[1]) Thunberg, l. c.

von der Wirkung dieser zwei- und dreibasischen organischen Säuren stark verschieden ist.

Die Oxydation dieser Säuren durch den Froschmuskel ist durch die Arbeit von Thunberg nicht erwiesen. Es könnte der Fall sein, daß diese Säuren den eigentlichen Gasaustausch des Muskels aktivieren, ohne hierbei selbst oxydiert zu werden, wie es z. B. die Phosphate tun. In den Versuchen von Thunberg zeigt der durch Zusatz der eben genannten Säuren bewirkte respiratorische Quotient Werte, die stets größer als 1 sind, aber recht große Schwankungen aufweisen, so daß diese Versuchsresultate keine genügende Stütze für die Annahme einer Oxydation dieser Säuren bieten.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir gerade auf Grund der Werte des respiratorischen Quotienten auf eine Oxydation der Apfel-, Fumar- und Citronensäure geschlossen. Fügt man zum Muskelgewebe diese Säuren hinzu, so beobachtet man gewöhnlich eine Steigerung des Gasaustausches, die einem respiratorischen Quotienten 4:3 entspricht. Nun ist dieser respiratorische Quotient derselbe, der einer vollständigen Verbrennung dieser Säuren zu Kohlensäure und Wasser entspricht. Wir hatten außerdem gefunden, daß bei Benutzung des Lebergewebes der durch Zusatz von Fumar- und Apfelsäure bewirkte respiratorische Quotient ebenfalls 4:3 beträgt. Bei Zusatz von Citronensäure zum Lebergewebe erhält man hingegen oft viel höhere Werte. Diese Steigerung des respiratorischen Quotienten ist durch eine energische Spaltung der Citronensäure bedingt, die auch in Sauerstoffabwesenheit vor sich gehen kann. Ähnliche Resultate erzielt man auch bei Anwendung der Niere. Die Citronenensäure wird durch die Leber und die Niere vielleicht in Itakonsäure, Kohlensäure und Wasser gespalten. Wir haben diesen Punkt nicht näher untersucht, sprechen also einfach eine Vermutung aus.

Thunberg[2]) hatte beobachtet, daß die Citronen-, Apfel- und Fumarsäure die Kohlensäureabgabe des Froschmuskels auch

---

[1]) Battelli und Stern, Oxydation des acides malique, fumarique et citrique par les tissus animaux. Soc. de Biol. 69, 552, 1910.

[2]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe; VI. Mitteilung. Skand. Arch. 24, 72, 1910.

in Abwesenheit von Sauerstoff steigert. Thunberg fragt sich, „inwieweit auch sonst die anoxybiotische Atmung durch eine Spaltung von Di- und Polycarbonsäuren bedingt ist; man fragt sich weiter, ob für diese Spaltung die vitale Struktur notwendig ist oder ob spezifische Enzyme, ‚Polycarbonasen' die wirksamen Substanzen sind".

Wir haben bereits erwähnt, daß die Gewebe der höheren Tiere bei Sauerstoffausschluß nicht die Fähigkeit besitzen, aus Apfel- und Fumarsäure Kohlensäure abzuspalten. Unter denselben Versuchsbedingungen bewirken die Leber und die Niere eine recht energische Spaltung der Citronensäure. Die Muskeln hingegen bewirken entweder gar keine oder nur eine geringe Spaltung der Citronensäure bei Sauerstoffausschluß, denn Zusatz von Citronensäure steigert die Kohlensäureabgabe nur wenig oder überhaupt nicht. In vorliegender Arbeit wollen wir uns nicht weiter mit der anoxybiotischen Spaltung der Citronensäure durch die Tiergewebe befassen. Wir haben sie hier bloß erwähnt, weil dieser Spaltungsprozeß die Werte des respiratorischen Quotienten beeinflussen kann. Wie wir bereits gesagt haben, sind es eben die Werte des respiratorischen Quotienten, auf die wir uns hauptsächlich stützen, um in unseren Versuchen eine Verbrennung der genannten Säuren anzunehmen.

Um die Verbrennung der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure zweifellos dartun zu können, müßte man beweisen, daß am Ende des Versuchs die Menge der zerstörten Säure der Menge des aufgenommenen Sauerstoffs oder der produzierten Kohlensäure entspricht. Wir haben zahlreiche Versuche gemacht, um die Menge der zu den Geweben hinzugesetzten Citronensäure zu messen, aber die hierbei erzielten Resultate sind durchaus nicht zufriedenstellend. Eine exakte quantitative Bestimmung geringer Mengen Citronensäure in Gegenwart großer Mengen Gewebe, wie es in unseren Versuchen notwendig war, weist große Schwierigkeiten auf. Noch schwerer schien uns die quantitative Bestimmung der Fumar- und Apfelsäure.

In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir Citronensäure benutzt, weil diese Säure energischer verbrannt wird als die Apfel- und Fumarsäure. Wie wir aber weiter unten sehen werden, sind die wichtigsten Versuchsergebnisse auch durch Versuche mit den beiden letzteren Säuren kontrolliert worden.

II. Methode.

Allgemeine Methode. Das in der Mehrzahl unserer Versuche benutzte Verfahren ist dasselbe, das wir in unseren vorhergehenden Untersuchungen über die Atmung der isolierten Tiergewebe, über die Urikooxydase usw. benutzt haben. Die Gewebesuspension wird in eine große Flasche gebracht und in einer Sauerstoffatmosphäre energisch geschüttelt. Eine Flasche dient als Kontrollprobe. In die andere Flasche fügt man die nötige Citronensäuremenge in Form von citronensaurem Natrium hinzu. Während der ganzen Dauer des Versuches tauchen die Flaschen in das Wasser eines Thermostaten. Am Ende des Versuches wird die aufgenommene Sauerstoffmenge und die produzierte Kohlensäuremenge nach den üblichen Methoden berechnet.

Ist die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe in dem die Citronensäure enthaltenden Reaktionsgemisch größer als in der Kontrollprobe, so schließt man daraus auf eine Oxydation der Citronensäure durch das gegebene Gewebe.

Berechnung der verbrannten Säuremenge. Die Menge der verbrannten Citronen-, Fumar- und Apfelsäure wird aus der Steigerung der Sauerstoffaufnahme berechnet. Es genügt, in Erwägung zu ziehen, daß 1 g Citronensäure zu seiner vollständigen Verbrennung zu Kohlensäure und Wasser 524 ccm Sauerstoff, 1 g Apfelsäure 501 ccm Sauerstoff, und 1 g Fumarsäure 579 ccm Sauerstoff verlangt. Für die Berechnung der verbrannten Fumar- und Apfelsäure kann auch die Steigerung der Kohlensäurebildung in Betracht gezogen werden; betreffend die Citronensäure aber haben wir bereits erwähnt, daß ein Teil der Kohlensäure aus einer Spaltung hervorgehen kann, namentlich wenn man die Leber oder die Niere benutzt.

Zubereitung der Gewebe in frischem Zustande. Diese Zubereitung ist sehr einfach. Das Gewebe wird so schnell wie möglich nach dem Tode des Tieres benutzt, in einer Fleischhackmaschine fein zerrieben und mit Wasser versetzt, so daß ein flüssiges Gemenge entsteht (150 ccm Wasser für je 50 g Gewebe z. B.). Es empfiehlt sich, größere Mengen Gewebe zu benutzen, 50 g z. B., weil auf diese Weise deutlichere Resultate erzielt werden.

Zubereitung des Muskelrückstandes. Der Muskelrückstand wird in folgender Weise bereitet. Der so frisch wie möglich entnommene Muskel wird fein zerrieben, mit dem 3fachen Volumen Wasser versetzt, 5 Minuten lang verrührt und durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt. Zu dem auf diese Weise erhaltenen Muskelrückstand fügt man das 4fache Volumen Wasser hinzu und verfährt im übrigen wie beim nicht gewaschenen Muskel.

Die günstigsten Versuchsbedingungen, um eine energische Verbrennung der genannten Säuren zu erzielen. Die Verbrennungsgeschwindigkeit der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch die isolierten Tiergewebe hängt von mehreren Faktoren ab, unter denen die wichtigsten folgende sind: die Art und der Zustand der benutzten

Gewebe, die Dauer des Schüttelns, die Temperatur des Thermostaten, der osmotische Druck, die Reaktion des Mediums, die Konzentration der zu untersuchenden Säuren und die Sauerstoffspannung.

Der Einfluß der Art und des Zustandes der Gewebe kann nicht durch eine sich auf alle Fälle erstreckende Regel ausgedrückt werden. Die Wirkung der anderen Faktoren ist im Gegenteil ziemlich allgemein. Wir werden später sehen, daß die energischste Verbrennung der genannten Säuren erzielt wird, wenn das Gewebe bei einer Temperatur von 40°, in Gegenwart von einfachem Wasser, in neutralem Medium in einer reinen Sauerstoffatmosphäre geschüttelt wird, wobei die Konzentration der betreffenden Säuren ungefähr 0,4:100 als wasserfreies Natronsalz berechnet, beträgt. Die Menge der verbrannten Säure hängt natürlich von der Dauer des Schüttelns ab; im allgemeinen genügt eine Dauer von 45 Minuten, und man hat somit den Vorteil, die Wirkung von Mikroorganismen auszuschließen.

Die soeben besprochenen Versuchsbedingungen sind auch in der Mehrzahl unserer Versuche realisiert worden.

Die Gewebe stammten teils von durch Verbluten getöteten Laboratoriumstieren, teils wurden sie aus dem Schlachthofe bezogen.

III. Die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch die verschiedenen Tiergewebe.

Wir werden im folgenden Abschnitt sehen, daß die Gewebe, die ihre Hauptatmung nicht mehr besitzen, auch die Fähigkeit verloren haben, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Werden die Gewebe erst längere Zeit nach dem Tode des Tieres entnommen, so ist die Hauptatmung geschwächt und zugleich auch die Oxydationsfähigkeit gegenüber diesen Säuren verringert.

Aus dem Grunde müssen die Gewebe so frisch wie möglich benutzt werden. Bei den Laboratoriumstieren bietet dies keine Schwierigkeit, aber die aus dem Schlachthofe bezogenen Gewebe konnten nicht früher als $1^1/_2$ Stunden nach dem Tode der Tiere zur Verwendung gelangen.

Die von den Laboratoriumstieren (Hund, Kaninchen) stammenden Gewebe konnten bereits 15 bis 20 Minuten nach dem Tode des Tieres auf die Schüttelmaschine gebracht werden, während für die Gewebe des Rindes, des Hammels oder des Pferdes dies erst $1^1/_2$ Stunden nach dem Tode der Tiere geschehen konnte.

In diesen Versuchen wurden 100 g fein zerriebenen Gewebes ohne jede Vorbehandlung mit dem 3fachen Volumen gewöhnlichen Wassers versetzt und in der vorher angegebenen Weise energisch geschüttelt.

In der Tabelle I stellen wir die Resultate, die wir mit den verschiedenen Geweben erzielt haben, zusammen. Jede Zahl entspricht einem Durchschnittswerte von mindestens 4 Versuchen; aber für mehrere Gewebe sind die Durchschnittswerte das Resultat einer bedeutend größeren Anzahl von Versuchen.

Tabelle I.

Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch die verschiedenen Gewebe. Die angeführten Werte bezeichnen die Zahl der Kubikzentimeter des aufgenommenen Sauerstoffs und der entwickelten Kohlensäure durch 100 g Gewebe während einer Schütteldauer von 45 Minuten. Der respiratorische Quotient bezieht sich auf die durch Zusatz der genannten Säuren bewirkte Steigerung (+ Zeichen) des Gasaustausches. Das Gewicht der Citronensäure (C), Fumarsäure (F) und Apfelsäure (M) ist als wasserfreies Natronsalz berechnet.

Gewebe	Citronen-, Apfel- oder Fumarsäure g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm	Respiratorischer Quotient
Muskel von Rind	00	82	107	—
idem	C: 1,5	+ 66	+ 98	1,48
idem	F: 1,5	+ 59	+ 79	1,34
idem	M: 1,5	+ 41	+ 58	1,41
Muskel von Pferd	00	67	99	—
idem	C: 1,5	+ 42	+ 70	1,66
idem	F: 1,5	+ 34	+ 47	1,38
idem	M: 1,5	+ 21	+ 28	1,33
Muskel von Hund	00	48	73	—
idem	C: 1,5	+ 27	+ 39	1,44
idem	F: 1,5	+ 21	+ 29	1,37
idem	M: 1,5	+ 16	+ 24	1,5
Muskel von Kaninchen	00	37	61	—
idem	C: 1,5	+ 19	+ 27	1,42
Leber von Rind	00	61	63	—
idem	C: 1,5	+ 8	+ 49	6,11
idem	F: 1,5	+ 6	+ 10	1,66
idem	M: 1,5	+ 4	+ 6	1,50
Leber von Pferd	00	54	75	—
idem	C: 1,5	+ 26	+ 77	2,96
idem	F: 1,5	+ 22	+ 28	1,27
idem	M: 1,5	+ 12	+ 17	1,41
Leber von Hammel	00	83	85	—
idem	C: 1,5	+ 28	+ 85	3,03
idem	F: 1,5	+ 29	+ 43	1,48
idem	M: 1,5	+ 14	+ 20	1,42
Leber von Hund	00	88	103	—
idem	C: 1,5	+ 64	+ 116	1,81
idem	F: 1,5	+ 47	+ 71	1,51
idem	M: 1,5	+ 44	+ 56	1,27
Niere von Rind	00	79	114	—
idem	C: 1,5	+ 42	+ 89	2,11
idem	F: 1,5	+ 37	+ 56	1,51
idem	M: 1,5	+ 28	+ 41	1,46
Niere von Pferd	00	43	72	—
idem	C: 1,5	+ 14	+ 27	1,92
idem	F: 1,5	+ 11	+ 16	1,45
Lunge von Pferd	00	27	68	—
idem	C: 1,5	+ 4	+ 6	—
Lunge von Pferd	00	26	45	—
idem	C: 1,5	+ 3	+ 5	—

Um die Berechnung in der Tabelle einfacher zu gestalten, haben wir die Werte der gesamten Kohlensäure angegeben, d. h. die präexistierende Kohlensäure + neugebildete Kohlensäure. Aus dem Grunde ist der respiratorische Quotient der Gewebe auch ohne Zusatz der organischen Säuren höher als 1.

In allen diesen Versuchen waren die Flaschen mit reinem Sauerstoff gefüllt, und die Temperatur des Thermostaten betrug 40° C.

Wie wir bereits hervorgehoben haben, stellen die angeführten Werte Durchschnittszahlen vor. In der Mehrzahl der Versuche weichen die gefundenen Werte nicht beträchtlich von den in der Tabelle angegebenen ab; die Unterschiede überschreiten nicht 50%. Immerhin gibt es hiervon Ausnahmen, und in mehreren Fällen erzielt man für die Muskeln des Rindes oder des Pferdes, die Niere des Rindes usw. sehr geringe Werte, obgleich diese Gewebe sonst ein normales Verhalten aufweisen und sehr schnell nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangten. Man könnte dieses Resultat der Tatsache zuschreiben, daß aus bisher unbekannten Gründen die Hauptatmung eine außergewöhnlich schnelle Abschwächung erfahren hat.

Unter den daraufhin untersuchten Geweben sind es vor allem die Muskeln des Rindes und des Pferdes, die Leber des Hundes und die Niere des Rindes, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure am energischsten oxydieren. Doch darf nicht außer acht gelassen werden, daß die Leber des Hundes sofort nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangte. Wartet man $1^1/_2$ Stunden, wie es für die aus dem Schlachthofe bezogenen Gewebe der Fall ist, so erhält man nur sehr niedrige Werte, wie wir es im folgenden Kapitel zeigen werden.

Es ist natürlich überflüssig zu bemerken, daß die in der Tabelle angegebenen Zahlen nur für die angegebenen Versuchsbedingungen gelten können. Eine Änderung der Versuchsbedingungen würde natürlich eine völlige Änderung der Oxydationswerte verursachen. Es muß ganz besonders hervorgehoben werden, daß die angegebenen Werte durchaus nicht als Ausdruck der Oxydationsintensität dieser Säuren durch die verschiedenen Gewebe im lebenden Organismus aufgefaßt werden dürfen. So dürfen wir zum Beispiel nicht die Behauptung aufstellen, daß im lebenden Tiere der Kaninchenmuskel weniger energisch Citronensäure verbrennt als der Rinder- oder der Pferdemuskel. In der Tat weist der die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkende Prozeß eine große Labilität auf, und es ist leicht möglich, daß dieser Prozeß im Kaninchenmuskel labiler sei, als im Rindermuskel.

Die drei genannten Säuren werden nicht mit derselben Intensität verbrannt. Die Citronensäure scheint in der Beziehung die erste Stelle einzunehmen, in zweiter Linie folgt die Fumarsäure, während die Oxydation der Apfelsäure viel schwächer ist. Thunberg[1]) bekommt für den Froschmuskel ähnliche Resultate.

---

[1]) Thunberg, l. c., IV. Mitteilung.

Der durch die Oxydation dieser Säuren bewirkte respiratorische Quotient beträgt für den Muskel annähernd 1,33, der in der Tat dem respiratorischen Quotienten der völligen Verbrennung dieser Säuren entspricht. In der Mehrzahl der Fälle ist der respiratorische Quotient etwas höher als 1,33, was sich leicht aus dem Umstande erklären läßt, daß die eigene Atmung des Muskels, deren Quotient nicht höher als 1 ist, teilweise durch die Oxydation dieser Säuren ersetzt wird.

Der respiratorische Quotient, der der Oxydation der Fumar- und Apfelsäure entspricht, ist auch für die Leber und die Niere ungefähr 1,33, gewöhnlich etwas höher. Für die Citronensäure ist der respiratorische Quotient sehr hoch, und zwar muß dies der Tatsache zugeschrieben werden, daß in der Leber und der Niere zugleich mit der Oxydation auch eine Spaltung der Citronensäure stattfindet, die zur Kohlensäurebildung führt. Selbstverständlich ist der respiratorische Quotient sehr hoch, wenn die Oxydation unbedeutend ist, da die Kohlensäuremenge, die aus der Spaltung der Citronensäure hervorgeht, keine Veränderung erleidet, während die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs sehr gering ist. So haben wir zum Beispiel bei Benutzung der Rinderleber für den respiratorischen Quotienten einen Durchschnittswert von 6,11 erhalten.

Wird der Versuch unter denselben Bedingungen aber bei Sauerstoffausschluß ausgeführt, so beobachtet man, daß Zusatz von Fumar- und Apfelsäure zum Muskel, zur Leber oder zur Niere keine Kohlensäurebildung hervorruft. Die Citronensäure hingegen kann eine beträchtliche Kohlensäuremenge bilden, wenn sie zum Leber- oder Nierengewebe hinzugesetzt wird. Der Muskel besitzt in einigen Fällen nicht die Fähigkeit, aus Citronensäure bei Sauerstoffausschluß Kohlensäure zu bilden, in anderen Fällen scheint eine anoxybiotische Kohlensäurebildung, wenn auch in geringem Grade, stattzufinden. Wenn ein Muskel die Fähigkeit besitzt, Citronensäure, wenn auch in geringem Maße, anoxybiotisch zu spalten, so ist der durch Citronensäurezusatz bedingte respiratorische Quotient größer als gewöhnlich. So sind die Durchschnittswerte des respiratorischen Quotienten bei der Oxydation der Citronensäure durch den Pferdemuskel höher als die bei der Oxydation der Fumar- und Apfelsäure erzielten.

IV. Labilität des Oxydationsvermögens in den verschiedenen Tiergeweben gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure nach dem Tode.

In früheren Arbeiten[1]) haben wir gezeigt, daß nach dem Tode des Tieres die Hauptatmung je nach den Geweben mehr oder minder schnell abnimmt. Das einfachste Verfahren, um zu erkennen, ob ein gegebenes Gewebe noch die Hauptatmung besitzt, ist zu untersuchen, ob der Gas-

[1]) Battelli und Stern, Recherches sur la conservation de l'activité respiratoire dans les différents tissus après la mort. Journ. de Physiol. et Pathol. génér. 1907, 410.

austausch des betreffenden Gewebes durch Zusatz von Pnein aktiviert werden kann. Ist das Pnein ohne Wirkung, so folgert man, daß das Gewebe die Hauptatmung völlig verloren hat.

Wir haben das Fortbestehen des Oxydationsvermögens der verschiedenen Gewebe gegenüber der Citronensäure untersucht. In gleichzeitig angestellten Parallelversuchen wurde das zu untersuchende Gewebe mit Pnein versetzt, um zu sehen, ob die Verminderung oder das Verschwinden des Oxydationsvermögens gegenüber der Citronensäure mit der Verminderung oder dem Verschwinden der Hauptatmung Hand in Hand geht.

In den hierher gehörigen Versuchen wurde das zu untersuchende Gewebe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (18° C ungefähr) bis zum Beginn des Versuches gehalten. Das Gewebe wurde sodann zerrieben, mit dem 3fachen Volumen gewöhnlichen Wassers oder Muskelextrakts versetzt und hierauf mit oder ohne Citronensäurezusatz unter den im vorigen Kapitel angegebenen Versuchsbedingungen geschüttelt.

Der Muskelauszug wurde in der Weise hergestellt, daß man den zerriebenen Rindermuskel mit dem 2fachen Volumen Wasser versetzte, 5 Minuten lang durchschüttelte und hierauf durch ein Leinwandtuch preßte.

Wir haben zunächst festgestellt, daß die Gewebe die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, schneller verlieren als die Fähigkeit, durch Pnein in bezug auf ihren Gasaustausch aktiviert zu werden. Die Leber des Hundes oxydiert gleich nach dem Tode des Tieres Citronensäure sehr energisch; diese oxydierende Fähigkeit nimmt nach und nach ab und verschwindet ungefähr 2 bis 3 Stunden nach dem Tode fast gänzlich. Die Wirkung des Pneins nimmt ebenfalls allmählich ab und hört größtenteils 3 Stunden nach dem Tode des Tieres auf.

Die Niere des Rindes sowie die Muskeln des Pferdes und des Rindes bewahren längere Zeit die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren. Natürlich ist dieses Oxydationsvermögen um so stärker, je frischer der Muskel ist, doch besteht die oxydierende Wirkung, wenn auch in geringem Grade, noch 24 Stunden oder länger nach dem Tode fort. Das Pnein kann den Gasaustausch dieser Gewebe auch dann noch erhöhen, wenn die oxydierende Wirkung gegenüber Citronensäure bereits verschwunden ist.

In verschiedenen Versuchen haben wir auch beobachtet, daß die oxydierende Wirkung gegenüber der Fumar- und Apfelsäure mit der Oxydation der Citronensäure Hand in Hand geht. Die Beobachtungen, die wir betreffend die Oxydation der Citronensäure gemacht haben, können also ohne weiteres auch auf die beiden anderen Säuren bezogen werden. Wie aus der Tabelle I hervorgeht, wird die Citronensäure am energischsten durch die Leber des Hundes, die Niere des Rindes, die Muskeln des Pferdes und des Rindes oxydiert. Die Leber des Hundes besitzt den Nachteil, dieses Oxydationsvermögen schnell einzubüßen. Die anderen soeben genannten Gewebe bieten hingegen den doppelten Vorteil, ein sehr energisches Oxydationsvermögen zu besitzen und dieses Vermögen längere Zeit zu bewahren.

Die Muskeln des Rindes und des Pferdes sowie die Niere des Rindes eignen sich also am besten für das Studium der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Diese Gewebe sind auch größtenteils in unseren Versuchen benutzt worden.

Die Labilität des die Oxydation dieser Säuren bewirkenden Prozesses bringt es mit sich, daß die Resultate sehr unbeständig sind, und man ist deshalb gezwungen, ein und denselben Versuch mehrmals zu wiederholen, um die Versuchsbedingungen feststellen zu können.

Anderseits bewahren die Gewebe, deren Hauptatmung nach dem Tode am längsten fortdauert, auch am längsten die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren. Endlich besitzen die Gewebe, deren Gasaustausch durch Pnein stark aktiviert wird, auch ein starkes Oxydationsvermögen gegenüber der Citronensäure. So verliert zum Beispiel die Niere des Pferdes, deren Hauptatmung ungefähr 3 Stunden nach dem Tode verschwindet, die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, bereits 2 Stunden nach dem Tode. Die Leber des Pferdes, des Rindes oder des Hammels liefert in bezug auf die Fortdauer ihrer Hauptatmung unbeständige Resultate. Im allgemeinen aber beobachtet man, daß, wenn zu einer gegebenen Zeit die Atmung der Leber durch Pnein stark aktiviert wird, das betreffende Gewebe auch eine energische Oxydation der Citronensäure bewirkt, während umgekehrt die Oxydation der Citronensäure nur gering ist oder überhaupt ausbleibt, sobald die aktivierende Wirkung des Pneins nur gering ist.

Recht beständige Resultate erzielt man bei Anwendung von Hundeleber, Rinderniere, Rinder- und Pferdemuskel.

V. Das Oxydationsvermögen des Muskelrückstandes.

In den bisher besprochenen Versuchen wurde das Gewebe ohne vorherige Behandlung außer der Zerkleinerung benutzt.

Wir haben außerdem eine Anzahl von Versuchen gemacht, in denen der Muskelrückstand, der nach dem eingangs beschriebenen Verfahren dargestellt war, benutzt wurde. Thunberg hat ähnliche Versuche mit dem Froschmuskel angestellt, wie wir bereits erwähnt haben.

In diesen unseren Versuchen haben wir die Beobachtung gemacht, daß der Muskelrückstand des Rindes oder des Pferdes Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bisweilen mit einer Energie oxydiert, die nicht viel hinter der des nicht vorbehandelten Muskels zurücksteht. Häufiger jedoch weist der Muskelrückstand ein viel geringeres Oxydationsvermögen auf als der nicht vorbehandelte Muskel. In einigen seltenen Fällen war die Oxydationswirkung des Muskelrückstandes ausgesprochener als die des nicht gewaschenen Muskels.

Der Muskelrückstand des Hundes und namentlich des Kaninchens oxydiert Citronensäure im allgemeinen schwächer als der entsprechende nicht vorbehandelte Muskel. Diese Beobachtung kann in Zusammenhang mit der Tatsache gebracht werden, daß die eben genannten Muskeln Rückstände liefern, deren respiratorische Tätigkeit durch Pnein nur schwach gesteigert wird.

Wir können also im allgemeinen schließen, daß die Benutzung des Muskelrückstandes für das Studium der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure keinerlei Vorteil gegenüber dem nicht gewaschenen Muskel bietet.

Der respiratorische Quotient, der durch die Oxydation der genannten Säuren unter dem Einflusse des Muskelrückstandes bedingt ist, beträgt ebenfalls ungefähr 1,33. In der Beziehung ist das Resultat häufig deutlicher bei Anwendung des Muskelrückstandes, weil die eigentliche Atmung des Muskels in dem Falle nur gering ist und somit der größte Teil des Gasaustausches auf Rechnung der Oxydation der eben genannten Säuren zu setzen ist.

Der durch einmalige Extraktion bereitete Muskelrückstand des Pferdes oder des Rindes verliert fast vollständig die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, wenn er nochmals mit dem 4fachen Volumen Wasser extrahiert wird. Eine dritte Wiederholung dieser Behandlung vernichtet dieses Oxydationsvermögen völlig. Der auf diese Weise durch mehrmaliges Auswaschen dargestellte Muskelrückstand weist fast keine Atmungsfähigkeit auf, doch ruft Zusatz von Pnein einen nicht unmerklichen Gasaustausch hervor. Hier zeigt sich von neuem, daß, wie wir es bereits im vorhergehenden Abschnitte gesehen, das Pnein den Gasaustausch der Gewebe noch aktivieren kann, wenn die oxydierende Wirkung derselben gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bereits verschwunden ist.

Der die Oxydation dieser Säuren bewirkende Prozeß scheint gegen die Wasserbehandlung eine geringe Resistenz zu bieten und unterscheidet sich in der Beziehung auffallend von dem der Bernsteinsäureoxydation zugrunde liegenden Prozesse. Wir haben in der Tat in einer früheren Arbeit[1]) gezeigt, daß trotz mehrmals wiederholtem Auswaschen der Muskel seine oxydierende Wirkung auf Bernsteinsäure unvermindert bewahrt.

VI. Versuche, die die Citronensäureoxydation bewirkende Substanz darzustellen.

Wir haben mehrfach versucht, die in den Geweben enthaltene Substanz oder Substanzen darzustellen, die die Fähigkeit besitzen, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren.

Wir haben vergeblich versucht, eine wässerige Lösung dieser Substanz darzustellen. Der fein zerriebene Muskel wird mit dem 2fachen Volumen Wasser versetzt, verschieden lange Zeit (5 bis 20 Minuten) geschüttelt und durch ein Leinwandtuch gepreßt. Man erhält auf diese Weise einen Muskelrückstand und einen Auszug. Letzterer besitzt nicht im geringsten die Fähigkeit, Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Der Muskelrückstand hingegen oxydiert diese Säuren mehr oder weniger energisch, wie wir es bereits gesehen haben.

Es ist uns nicht gelungen, die aktiven Substanzen durch Alkohol- oder Acetonbehandlung darzustellen. Das fein zerriebene Gewebe wird 5 Minuten lang mit dem 2fachen Volumen Alkohol oder Aceton ver-

[1]) Battelli und Stern, l. c.; diese Zeitschr. 30, 172, 1910.

rührt, durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt und der auf diese Weise erhaltene Rückstand im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Das auf diese Weise dargestellte Gewebepulver besitzt keine oxydierende Fähigkeit gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

In der Beziehung verhalten sich die die Citronensäureoxydation bewirkenden Substanzen ähnlich den Substanzen, die in der Hauptatmung die wichtigste Rolle spielen, oder wie die die Bernsteinsäure zu Apfelsäure oxydierenden Körper. Die wässerigen Auszüge sowie die Alkohol- und Acetonniederschläge der Gewebe besitzen nicht die Hauptatmung und oxydieren auch nicht die Bernsteinsäure. Hingegen sind die Substanzen, die bei der akzessorischen Atmung mitwirken, sowie die Urikooxydase und die Alkoholoxydase in Wasser löslich und können durch Alkohol und Aceton präcipitiert werden.

VII. Einfluß der Reaktion des Mediums.

Die Reaktion des Mediums wird in den hierher gehörigen Versuchen durch Zusatz von NaOH oder HCl erhalten.

Es muß hierbei bemerkt werden, daß die Verbrennung des citronensauren Natriums die Reaktion während des Versuches beständig in der Weise abändert, daß die Reaktion stärker alkalisch oder weniger sauer wird. Doch sind diese Änderungen nur geringfügig, da die Menge der verbrannten Citronensäure relativ unbedeutend ist.

In der Tabelle II stellen wir die Resultate zweier typischer Versuchsreihen zusammen.

Tabelle II.

Einfluß der Reaktion des Mediums auf die Oxydation der Citronensäure. Jede Flasche enthält 100 g frischen Rindermuskels, 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Dauer des Schüttelns 45 Minuten. Temperatur des Thermostaten 40° C.

Reaktion des Mediums	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Neutral gegen Lackmus	00	102	141
idem	1,50	+ 73	+ 98
NaOH 1:5000	00	126	163
idem	1,50	+ 71	+ 99
NaOH 1:2000	00	150	182
idem	1,50	+ 29	+ 41
NaOH 1:1500	00	154	180
idem	1,50	+ 11	+ 14
NaOH 1:1000	00	18	47
idem	1,50	+ 1	+ 3
Neutral gegen Lackmus	00	87	125
idem	1,50	+ 64	+ 91
HCl 1:4000	00	59	92
idem	1,50	+ 62	+ 86
HCl 1:2000	00	31	61
idem	1,50	+ 37	+ 53
HCl 1:1000	00	16	43
idem	1,50	+ 13	+ 18

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse sind durch mehrere andere Versuche bestätigt worden. Die frische Rinderniere zeigt ein ähnliches Verhalten in bezug auf die Oxydation der Citronensäure.

Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß, wenn die Reaktion des Mediums neutral oder leicht alkalisch oder leicht sauer ist, die Oxydation der Citronensäure nahezu die gleiche Intensität aufweist. Mit steigender Säure- oder Alkalikonzentration nimmt die Oxydationsenergie ab und hört endlich fast gänzlich auf.

Vergleicht man den Reaktionsverlauf der Citronensäureoxydation mit dem der eigentlichen Atmung des Muskels, so beobachtet man folgendes:

Eine schwache Alkalinität (NaOH 1:5000 oder 1:4000 z. B.) steigert die eigentliche Atmung, ohne die Oxydation der Citronensäure zu stören; bei einer Alkalinität von ungefähr 1:2000 NaOH bemerkt man eine größere Steigerung der eigentlichen Atmung des Muskels, während hingegen die Citronensäureoxydation stark vermindert oder völlig aufgehoben ist. Man kann also annehmen, daß eine mäßige Alkalinität für die Oxydation der in den Muskeln selbst enthaltenen Substanzen günstiger ist als für die Oxydation der hinzugesetzten Citronensäure.

Eine schwache Acidität (HCl 1:5000 oder 1:4000 z. B.) setzt die eigentliche Atmung des Muskels schon bedeutend herab, ohne die Oxydation der Citronensäure merklich zu vermindern. Häufig ist die Oxydation der Citronensäure leicht vermehrt, namentlich wenn man zu den Versuchen den Muskelrückstand des Rindes benutzt.

Diese Wirkung des schwach sauren Mediums kann auf zweierlei Art erklärt werden. Man könnte annehmen, daß in leicht saurem Medium die Oxydation der in den Muskeln selbst enthaltenen Substanzen verringert ist, während die Oxydation der hinzugesetzten Citronensäure keine Änderung erleidet. Oder man könnte auch voraussetzen, daß der oxydative Vorgang keinerlei Störung erleidet, daß aber ein anderer für die Hauptatmung der Gewebe notwendiger Vorgang (z. B. eine Hydrolyse) eine Abschwächung erleidet.

VIII. Einfluß der Temperatur.

In einer Reihe von Versuchen haben wir den Einfluß der Temperatur auf die Oxydationsintensität der Citronensäure geprüft. Die Gewebesuspension wurde auf die gewünschte Temperatur erwärmt, nachdem die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche mit reinem Sauerstoff gefüllt worden war, darauf wurde die nötige Menge Citronensäure hinzugefügt und dann erst mit dem Schütteln begonnen.

In der folgenden Tabelle ist eine typische Versuchsreihe wiedergegeben, deren Resultate durch andere in derselben Weise ausgeführte Versuche bestätigt sind.

Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß das Temperaturoptimum für die Oxydation der Citronensäure bei ungefähr 40° liegt. Dieses Optimum entspricht dem für die Hauptatmung und für die Oxydation der Bernsteinsäure gefundenen.

Tabelle III.

Einfluß der Temperatur auf die Oxydationsintensität der Citronensäure. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten. Jede Flasche enthält 100 g sehr frischen Gewebes und 300 ccm Wasser.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Temperatur in Zentigraden	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	30	57	78
idem	1,5	30	+ 39	+ 56
idem	00	40	81	102
idem	1,5	40	+ 57	+ 80
idem	00	45	50	68
idem	1,5	45	+ 46	+ 65
idem	00	50	38	52
idem	1,5	50	+ 29	+ 40
idem	00	55	23	32
idem	1,5	55	+ 7	+ 10

Die auf 70° erwärmten Gewebe verlieren vollständig die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren.

IX. Einfluß der Citronensäurekonzentration.

Die Konzentration der Citronensäure übt einen gewissen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben aus. In der folgenden Tabelle stellen wir die Resultate einer typischen Versuchsreihe zusammen.

Tabelle IV.

Einfluß der Konzentration der Citronensäure auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 100 g Gewebe und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Pferd	00	92	124
idem	0,10	+ 24	+ 36
idem	0,20	+ 35	+ 51
idem	0,50	+ 49	+ 70
idem	1,00	+ 59	+ 82
idem	1,50	+ 65	+ 90
idem	2,00	+ 57	+ 85
idem	3,00	+ 26	+ 37

Aus den in der Tabelle IV zusammengestellten Versuchsergebnissen ersieht man deutlich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit der Citronensäure bis zu einem gewissen Maximum mit steigender Konzentration zu-

nimmt, darauf aber wieder abnimmt. In der hier wiedergegebenen Versuchsreihe beträgt das Konzentrationsoptimum 1,5 g wasserfreien, citronensauren Natriums für 400 ccm Reaktionsgemisch, also ungefähr 0,4 : 100. Doch ist dieses Resultat nicht konstant, und das Konzentrationsoptimum weist in den verschiedenen Versuchen Abweichungen auf, die aber nur gering sind.

X. Einfluß der Sauerstoffspannung.

Die in den vorhergehenden Abschnitten mitgeteilten Versuche sind in einer Atmosphäre reinen Sauerstoffs ausgeführt worden. Wird der Sauerstoff durch gewöhnliche Luft ersetzt, so wird die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure beträchtlich vermindert. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die Oxydationsenergie in reinem Sauerstoff zweimal größer ist als in einer gewöhnlichen Luftatmosphäre.

In der Beziehung zeigt die Oxydation der Citronensäure ganz dasselbe Verhalten wie die Hauptatmung und die Oxydation der Bernsteinsäure, die in reinem Sauerstoff ebenfalls viel energischer verlaufen als in gewöhnlicher Luft. Die akzessorische Atmung sowie die Oxydation des Alkohols durch die Alkoholoxydase weisen hingegen in gewöhnlicher Luft dieselbe Energie auf wie in reinem Sauerstoff.

XI. Einfluß der Versuchsdauer.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß der die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkende Prozeß eine recht große Labilität aufweist und daß diese Labilität von einem Versuche zum andern wechselt. Es war folglich auch zu erwarten, daß die Verbrennungsenergie im Laufe des Versuches schnell abnehmen und daß die hierbei erzielten Resultate nicht konstant sein würden. Dies ist in der Tat auch der Fall.

Man kann im allgemeinen sagen, daß die Verbrennung der Citronensäure durch den Rinder- oder Pferdemuskel in gewöhnlichem Wasser und bei einer Temperatur von 40° während der ersten 30 Minuten langsam abnimmt, und hierauf gewöhnlich recht schwach wird oder selbst völlig aufhören kann. In einigen Fällen dauert jedoch die Verbrennung 45 Minuten lang mit ziemlich gleicher Energie fort und nimmt hierauf schnell ab.

Vergleicht man die Dauer der Citronensäureverbrennung mit der Dauer der eigentlichen Atmung der Muskeln, so bemerkt man auch hier Unregelmäßigkeiten. In einigen Fällen nimmt die eigentliche Atmung der Muskeln schneller ab als die Verbrennung der Citronensäure, in anderen Fällen findet das Gegenteil statt.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die praktische Schlußfolgerung, daß es unnütz ist, die Dauer des Schüttelns auf mehr als 45 Minuten auszudehnen, um fast das Maximum der Citronensäureverbrennung zu erzielen.

XII. Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die Gewebe.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß der Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die Muskeln verschieden ist, je nachdem die Muskeln mehr oder weniger schnell nach dem Tode der Tiere zur Verwendung gelangen.

Wird der Muskel des Pferdes oder des Rindes schnell nach dem Tode benutzt ($1^1/_2$ Stunden z. B.), so bewirkt Zusatz von dreifachem Volumen Blut keine oder eine kaum merkliche Verminderung des Oxydationsvermögens gegenüber Citronensäure. Mit anderen Worten — Zusatz von Citronensäure bewirkt annähernd dieselbe Steigerung des Gasaustausches der Muskeln, gleichgültig, ob diese in Wasser oder Blut suspendiert sind. Selbstverständlich ist die eigentliche Atmung des Muskels durch Zusatz von Blut stark gesteigert, wie wir es bereits in früheren Arbeiten gezeigt haben.

Wird der Muskel 4 oder 5 Stunden nach dem Tode des Tieres benutzt, so vollzieht sich die Oxydation der Citronensäure mit einer beträchtlichen Energie, wenn das Gewebe in Wasser suspendiert ist, hingegen ist diese Oxydation gering oder kaum merklich in Gegenwart von Blut. Zusatz von Blut steigert auch in dem Falle die eigentliche Atmung des Muskels bedeutend, aber Zusatz von Citronensäure bewirkt keine weitere Steigerung des Gasaustausches.

In bezug auf die Oxydation der Citronensäure durch die Muskeln ist also die Wirkung des Blutes ähnlich der des Kochsalzes, wenn der Muskel nicht mehr ganz frisch ist. Beim sehr frischen Muskel ist die Wirkung des Blutes von der des Kochsalzes streng verschieden.

Der Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die frische Rinderniere ist ebenfalls unbeständig. In einigen Fällen war diese Oxydation in Gegenwart von Blut ganz dieselbe wie in gewöhnlichem Wasser, in einigen anderen Fällen war sie hingegen mehr oder weniger vermindert. Nur in einem Falle haben wir eine bedeutende Steigerung der Oxydation in Gegenwart von Blut beobachtet. Diese einander widersprechenden Resultate könnten durch den verschiedenen Grad der Frische der Gewebe in bezug auf den Prozeß der Hauptatmung bedingt sein.

Das Blut selbst oxydiert Citronensäure nicht merklich.

XIII. Einfluß der Chloride und der Phosphate.

In allen bisher mitgeteilten Versuchen wurde zum zerriebenen Gewebe gewöhnliches Wasser hinzugesetzt. In besonderen Versuchen wurde auch der Einfluß mehrerer Salze und namentlich des Chlornatriums und des Natriumphosphats untersucht.

In der Tabelle V stellen wir einige typische Versuche zusammen.

Bei der Berechnung der Salzkonzentration wurde 1 g Gewebe wie 1 ccm Flüssigkeit betrachtet. Das Phosphat wurde als wasserhaltiges Na_2HPO_4, $12\,H_2O$ berechnet.

Tabelle V.

Einfluß der Chloride und Phosphate auf die Oxydation der Citronensäure. Jede Flasche enthält 100 g frischen Gewebes und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°.

Gewebe	Salzkonzentration pro 1000	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	00	96	142
idem	00	1	+ 72	+ 99
idem	NaCl: 0,8	00	121	163
idem	idem	1	+ 83	+ 114
idem	NaCl: 1,6	00	139	180
idem	idem	1	+ 37	+ 53
idem	NaCl: 3,2	00	134	171
idem	idem	1	+ 22	+ 31
idem	NaCl: 4,8	00	122	156
idem	idem	1	− 4	+ 3
idem	NaCl: 6,4	00	99	133
idem	idem	1	− 12	− 2
Muskel von Rind	00	00	84	126
idem	00	1	+ 63	+ 89
idem	Na_2HPO_4: 1	00	98	139
idem	idem	1	+ 61	+ 85
idem	Na_2HPO_4: 2	00	121	160
idem	idem	1	+ 54	+ 77
idem	Na_2HPO_4: 5	00	157	193
idem	idem	1	+ 29	+ 38
idem	Na_2HPO_4: 10	00	152	186
idem	idem	1	+ 13	+ 17

Es darf nicht außer acht gelassen werden, daß die in der Tabelle angeführten Versuchstypen nur ungefähr eine Idee von den in den verschiedenen Versuchen erzielten Resultaten geben. Die Resultate sind durchaus nicht konstant, und die Abweichungen können mitunter recht groß sein, namentlich in bezug auf den Einfluß der Salzkonzentration.

Im allgemeinen läßt sich sagen, daß das Chlornatrium in schwacher Konzentration die eigentliche Atmung des Muskels bedeutend steigert. Die Atmungsintensität nimmt von neuem deutlich ab, wenn das Chlornatrium eine Konzentration von ungefähr 6:1000 erreicht.

Die Verbrennung der Citronensäure ist etwas gesteigert, wenn die Konzentration des Chlornatriums sehr schwach ist (1:1000 z. B.), aber sobald die Konzentration etwas ansteigt (2 bis 3:1000 z. B.), wird die Verbrennung der Citronensäure bedeutend vermindert, und wenn die Konzentration des Chlornatriums 5:1000 beträgt, bewirkt der Zusatz von Citronensäure keine Steigerung des Gaswechsels, sondern eher eine Verminderung.

Wie hieraus zu ersehen, ist die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Verbrennung der Citronensäure stärker als auf die Oxydation der in dem Muskel selbst enthaltenen Substanzen. In der Tat

nimmt mit steigender Konzentration des Chlornatriums die Verbrennung der Citronensäure viel schneller ab als die eigentliche Atmung des Muskels.

Wir haben bereits gesehen, daß in Gegenwart von Blut der sehr frische Muskel Citronensäure ebenso stark oxydiert wie in gewöhnlichem Wasser. Da nun im Blutserum das Chlornatrium eine Konzentration von ungefähr 6:1000 erreicht, müßte die Verbrennung der Citronensäure verhindert sein. Man könnte also annehmen, daß im Blute Substanzen enthalten sind, die die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Verbrennung der Citronensäure aufheben.

Auf die Oxydation der Citronensäure durch die Niere wirkt Chlornatrium ähnlich wie auf den Muskel, mit dem Unterschied jedoch, daß die Oxydation der Citronensäure durch die Niere viel weniger beeinflußt wird als die Oxydation durch den Muskel. In der Tat beginnt die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Citronensäureoxydation durch die Niere erst bei einer Konzentration von 4 bis 5:1000.

Die Wirkung des Natriumphosphats weist eine gewisse Analogie mit der Alkaliwirkung auf. In schwacher Konzentration (1:1000 z. B.) steigert das Natriumphosphat die eigentliche Atmung des Muskels, ohne die Citronensäureoxydation zu beeinflussen. Mit steigender Konzentration des Natriumphosphats nimmmt die Atmung des Muskels bedeutend zu, während hingegen die Oxydation der Citronensäure stetig abnimmt. Die Niere des Rindes zeigt im allgemeinen dasselbe Verhalten.

XIV. Einfluß des Fluornatriums.

Unter den Giften wollen wir der Wirkung des Fluornatriums einen besonderen Platz anweisen, da es in ausgesprochener Weise die Fähigkeit besitzt, in passender Konzentration die Hauptatmung der Gewebe herabzusetzen, ohne ihr Oxydationsvermögen gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu verringern; häufig ist dieses Oxydationsvermögen sogar erhöht. In der folgenden Tabelle stellen wir 2 typische Versuchsreihen zusammen.

Die zwei in der Tabelle VI angeführten Versuchsreihen geben einen allgemeinen Begriff von den mit dem Fluornatrium erzielten Resultaten; selbstverständlich aber beobachtet man recht große Abweichungen von einem Versuche zum anderen. Man bemerkt, daß die eigentliche Atmung des Muskels durch Fluornatrium bereits in einer Konzentration von 1:1000 stark herabgesetzt ist; die Abschwächung nimmt mit steigender Konzentration des Fluornatriums sehr schnell zu. Die Oxydation der Citronensäure nimmt hingegen bis zu einer gewissen Grenze mit steigender Konzentration des Fluornatriums zu. Es kommt nicht selten vor, daß bei einer Fluornatriumkonzentration von 1 bis 3:1000 die Summe des durch die eigentliche Atmung des Muskels und durch die Oxydation der Citronensäure verbrauchten Sauerstoffs ungefähr konstant bleibt. Die Resultate sind bei Anwendung der Rinderniere noch deutlicher. So kann man z. B. die Beobachtung machen, daß in Gegenwart von Fluornatrium in einer Konzentration von 3:1000 die Oxydation der Citronensäure

stärker ist als sonst. Die Wirkung des Fluornatriums auf die eigentliche Atmung der Niere scheint viel weniger ausgesprochen als auf die Atmung des Muskels, weil in den in der Tabelle wiedergegebenen Versuchen der Gasaustausch der Niere hauptsächlich durch die akzessorische Atmung bewirkt wird, auf die das Fluornatrium eine verhältnismäßig geringe Wirkung ausübt.

Tabelle VI.

Einfluß des Fluornatriums auf die Intensität der Citronensäureoxydation. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 100 g Gewebe und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Konzentration des Fluornatriums	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	00	98	137
idem	1	00	+ 74	+ 97
idem	00	1:1000	62	98
idem	1	idem	+ 68	+ 93
idem	00	2:1000	46	81
idem	1	idem	+ 72	+ 98
idem	00	3:1000	36	69
idem	1	idem	+ 78	+ 105
idem	00	10:1000	11	42
idem	1	idem	+ 42	+ 57
Niere von Rind	00	00	102	124
idem	1	00	+ 54	+ 82
idem	00	1:1000	108	129
idem	1	idem	+ 62	+ 98
idem	00	2:1000	97	118
idem	1	idem	+ 64	+ 103
idem	00	3:1000	82	101
idem	1	idem	+ 76	+ 118
idem	00	10:1000	52	71
idem	1	idem	+ 38	+ 82

Ähnliche Resultate erzielt man bei Verwendung von Fumar- oder Apfelsäure an Stelle der Citronensäure.

Eine interessante Beobachtung ist, daß die Wirkung des Fluornatriums einen Gegensatz zur Wirkung des Chlornatriums bietet. In passenden Konzentrationen begünstigt das Chlornatrium die eigentliche Hauptatmung der Gewebe, während die Oxydation der Citronensäure vermindert wird. In entsprechenden Konzentrationen bewirkt das Fluornatrium das Gegenteil. Im allgemeinen kann man sagen, daß in dieser Beziehung das Chlornatrium sich wie die Alkalien oder das Natriumphosphat verhält, während die Wirkung des Fluornatriums der Wirkung der Säuren ähnlich ist, aber in viel stärker ausgesprochener Weise.

Zu bemerken ist endlich noch, daß in einer Konzentration von 1:100 das Fluornatrium die Oxydation der Bernsteinsäure vollständig aufhebt, während die Oxydation der Citronensäure noch recht energisch vor sich geht.

XV. Einfluß einiger anderer Gifte (Blausäure und arsenige Säure, Aldehyde, Galle).

Außer dem Fluornatrium haben wir auch die Wirkung einiger Gifte untersucht, deren Einfluß auf die eigentliche Atmung der Gewebe sowie auf die Oxydation der Bernsteinsäure wir bereits in früheren Arbeiten studiert hatten. Die hierher gehörigen Versuche sind ausschließlich am Muskel von Rind oder Pferd in gewöhnlichem Wasser ausgeführt worden.

Man kann im allgemeinen sagen, daß die Wirkung des Giftes um so energischer ist und bei einer um so geringeren Dosis auftritt, je frischer und aktiver der Muskel ist. Die Versuche, deren Ergebnisse wir hier auseinandersetzen wollen, sind an Muskeln von mittlerer Aktivität ausgeführt worden.

Unter den daraufhin untersuchten Substanzen besitzt die Blausäure die stärkste Giftwirkung, und zwar zeigt sich die hemmende Wirkung recht deutlich schon in einer Konzentration von 1:100000. In einer Konzentration von 1:3000 hebt die Blausäure die Citronensäureoxydation nicht vollständig auf.

Die arsenige Säure vermindert recht deutlich die eigentliche Hauptatmung des Muskels schon in einer Konzentration von 1:50000, aber die Oxydation der Citronensäure wird erst bei einer Konzentration von 1:10000 merklich herabgesetzt.

Der Formaldehyd vernichtet fast vollständig die Citronensäureoxydation in einer Konzentration von 1:2000, und der Salicylaldehyd übt die gleiche Wirkung in einer Konzentration von 2:1000. Die Wirkung des Äthylaldehyds ist viel schwächer; erst in einer Konzentration von 2:1000 bewirkt Äthylaldehyd eine merkliche Verminderung der Citronensäureoxydation.

Die Galle hemmt ebenfalls die Citronensäureoxydation recht energisch. Zusatz von 5 ccm Rindergalle zu 50 g Muskel hebt diese Oxydation fast völlig auf.

Diese eben genannten Gifte wirken demnach in ziemlich derselben Weise auf die Hauptatmung wie auf die Oxydation der Citronensäure durch den Muskel. Wir haben bereits erwähnt, daß das Fluornatrium in dieser Beziehung ein anderes Verhalten aufweist.

XVI. Beziehung zwischen der Hauptatmung und der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

In früheren Arbeiten waren wir zur Schlußfolgerung gelangt, daß die Hauptatmung der Gewebe durch das Zusammenwirken des fundamentalen Atmungsprozesses und des Pneins zustande komme. Das Pnein ist in Wasser löslich und sehr beständig. Der fundamentale Atmungsprozeß haftet fest an den unlöslichen Teilen der Gewebe und ist äußerst labil.

Der Aktivitätsgrad des fundamentalen Atmungsprozesses kann in einigen Fällen direkt durch Messung des Gasaustausches des Gewebes

selbst bestimmt werden, in den anderen Fällen hingegen kann diese Aktivität nur durch die Wirkung des Pneinzusatzes gemessen werden. So kann z. B. die Niere des Rindes einige Stunden nach dem Tode des Tieres einen ziemlich schwachen Gasaustausch aufweisen, aber es genügt, einen wässerigen Muskelauszug (Pnein) hinzuzusetzen, um eine sehr große Atmungstätigkeit hervorzurufen.

Wir haben bisher noch nicht bestimmen können, ob das Pnein ein Aktivator des fundamentalen Atmungsprozesses ist oder ob es die zum Verbrennen geeigneten Körper liefert.

Nun haben wir im Kapitel IV auseinandergesetzt, daß, wenn der fundamentale Atmungsprozeß eine große Tätigkeit aufweist, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure energisch oxydiert werden. Ist der fundamentale Atmungsprozeß abgeschwächt, so wird auch die Oxydation der genannten Säuren gering sein, und wenn endlich der fundamentale Atmungsprozeß vernichtet ist, so hört auch die Oxydation dieser Säuren völlig auf.

Wir schließen aus diesen Beobachtungen, daß die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch den fundamentalen Atmungsprozeß bewirkt wird.

Immerhin bemerkt man im Verhalten der Hauptatmung und der Verbrennung der eben genannten Säuren in einigen Fällen einige Abweichungen. Je nach den Versuchsbedingungen kann man eine energische Oxydation der in den Geweben enthaltenen Substanzen sowie der hinzugesetzten eben genannten Säuren beobachten; unter anderen Versuchsbedingungen wird der fundamentale Atmungsprozeß vorzugsweise die den Geweben eigentümlichen Substanzen angreifen und wieder unter anderen Bedingungen hauptsächlich die hinzugesetzte Citronen-, Fumar- und Apfelsäure verbrennen. So beobachtet man z. B., daß der sehr frische Muskel in gewöhnlichem Wasser eine energische Atmungstätigkeit aufweist und zugleich die hinzugesetzte Citronensäure energisch verbrennt. In genügend alkalischem Medium oder in Gegenwart von Kochsalz in genügender Konzentration verbrennt derselbe Muskel fast ausschließlich seine eigenen Substanzen und oxydiert kaum oder gar nicht die hinzugesetzte Citronensäure. In Gegenwart von NaFl in genügender Konzentration ist die Sauerstoffmenge, die zur Verbrennung der Citronensäure verbraucht wird, größer als die zur Verbrennung der im Muskel selbst enthaltenen Substanzen verbrauchte.

XVII. Vergleich zwischen der Wirkung des Pneins und der der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

Wir haben bereits erwähnt, daß Thunberg aus seinen am Froschmuskel angestellten Versuchen zur Schlußfolgerung gelangt, „daß die Eigenschaften, die Battelli und Stern für ihr Pnein gefunden haben, gar nicht ausschließen, daß es mit einer organischen Säure identisch ist".

Aus unseren Versuchen ergibt sich aber, daß das Pnein nicht als ein Gemisch von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufgefaßt werden kann. Der wichtigste Unterschied besteht im respiratorischen Quotienten.

Der respiratorische Quotient, der durch den Pneinzusatz bewirkt wird, übersteigt nicht den Wert 1, während der respiratorische Quotient, der durch die Oxydation der genannten Säuren bedingt wird, ungefähr den Wert 1,35 aufweist.

Außerdem existieren noch andere Unterschiede. So aktiviert das Pnein den respiratorischen Gasaustausch der Gewebe noch zu einer Zeit, wo dieselben die Fähigkeit bereits verloren haben, die genannten Säuren zu oxydieren, z. B. wenn die Gewebe zu spät nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangen (siehe Kapitel IV) oder wenn dieselben wiederholt gewaschen worden sind (siehe Kapitel V).

Die Steigerung des Gasaustausches, die durch Zusatz von Pnein zum Muskelrückstande, zur Niere oder zur Leber gleich nach dem Tode des Tieres in Gegenwart von Wasser bewirkt wird, ist bedeutend größer als die durch Zusatz von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkte. Die Mengen dieser Säuren, die demnach im Muskelextrakte enthalten sein müßten, dürften recht bedeutend sein und den üblichen analytischen Methoden zugänglich sein, während es bisher nicht gelungen ist, sie in den verschiedenen Tiergeweben nachzuweisen.

Die Wirkung der Bernsteinsäure ist von der des Pneins ganz verschieden. Es genügt, in Erwägung zu ziehen, daß die Oxydation dieser Säure von keiner Kohlensäurebildung begleitet ist.

XVIII. Allgemeine Betrachtungen.

Die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch die Tiergewebe ist hauptsächlich aus zweierlei Gründen interessant.

Erstens ist die Oxydation dieser Säuren das erste Beispiel von gut definierten Substanzen, die eine direkte und völlige Verbrennung durch die isolierten Tiergewebe erleiden. Zweitens scheint diese Verbrennung durch denselben Prozeß bewirkt zu sein wie die Hauptatmung der Gewebe.

Betrachtet man genauer die Resultate der Untersuchungen über die Oxydation von Substanzen von bestimmter chemischer Struktur durch die Tiergewebe, so bemerkt man vor allem, daß es bisher nicht gelungen ist, Kohlenhydrate, Fette, Fettsäuren, Glycerin oder Eiweißstoffe zu oxydieren.

Unter den Substanzen, die durch die isolierten Tiergewebe oxydiert werden können, erleiden die meisten eine viel zu langsame Oxydation, um einen merklichen Einfluß auf den Gasaustausch auszuüben. Wir wollen uns hier nicht weiter mit denselben befassen. Man kann immerhin behaupten, daß diese verschiedenen Substanzen eine nur oberflächliche Oxydation unter der Einwirkung spezieller Oxydationsfermente aufweisen.

Die Zahl der Substanzen, durch deren schnelle Oxydation der Gasaustausch der isolierten Tiergewebe merklich beeinflußt werden kann, ist ziemlich klein. Zu nennen sind: Alkohol, Harnsäure und vor allem Bernsteinsäure. Die Oxydation dieser eben genannten Substanzen ist keine tiefgehende und führt nur zur Bildung von intermediären Produkten: die Harnsäure wird zu Allantoin, die Bernsteinsäure zu Apfelsäure oxydiert.

Die Tatsache, daß hinzugesetzte Substanzen von bestimmter chemischer Struktur, wie die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure, durch die isolierten Tiergewebe völlig verbrannt werden, steht in der Geschichte der Gewebeatmung vereinzelt da.

Wir wollen nun zu den Prozessen übergehen, die die Oxydation der bisher bekannten Substanzen mit einer genügenden Schnelligkeit bewirken, um den Gasaustausch der Gewebe deutlich zu beeinflussen. Wir werden sofort bemerken, daß die Oxydationen des Alkohols, der Harnsäure, der Bernsteinsäure sowie der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch verschiedene Prozesse bedingt sind, die drei gänzlich verschiedene Typen vorstellen.

Den ersten Typus dieser Oxydationsfermente stellen die gut charakterisierten Oxydationsfermente vor. Die Harnsäure wird durch die Urikooxydase zu Allantoin, der Alkohol durch die Alkoholoxydase zu Essigsäure oxydiert. Die charakteristischen Merkmale dieses Typus von Oxydationsprozessen sind dieselben, die die bekannten Oxydationsfermente aufweisen. Diese Fermente sind in Wasser löslich, können in Pulverform durch Aceton- oder Alkoholbehandlung dargestellt werden und weisen ein Temperaturoptimum von 55° auf. Zu bemerken ist noch, daß das Vorkommen dieser Fermente auf einige Gewebe beschränkt ist (Leber, Niere u. a.) und daß ihre Menge in den Geweben längere Zeit nach dem Tode unverändert bleibt.[1]) Der Prozeß der akzessorischen Atmung gehört zur selben Kategorie von Oxydationsprozessen, da er dieselben Eigentümlichkeiten aufweist, obgleich die Art der hierbei oxydierten Substanzen noch unbekannt ist.[2])

---

[1]) Battelli und Stern, Untersuchungen über die Urikase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 19, 219, 1909. Dieselben: Die Alkoholoxydase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 28, 145, 1910.

[2]) Battelli und Stern, Die akzessorische Atmung in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 21, 487, 1909.

Den zweiten Typus von Oxydationsprozessen stellt die Oxydation der Bernsteinsäure zu Apfelsäure dar. Die wichtigsten Charaktere dieses Oxydationstypus sind die folgenden. Die Substanz oder die Substanzen, die die Oxydation der Bernsteinsäure bewirken, sind in Wasser unlöslich und werden durch Alkohol- und Acetonbehandlung vernichtet. Das Temperaturoptimum ist bei 40°, und bei 55° ist die Oxydation nur unbedeutend. Die Oxydationsenergie bleibt lange Zeit nach dem Tode des Tieres unverändert und wird durch wiederholtes und längeres Auswaschen der Gewebe mit Wasser nicht vermindert. Es muß außerdem bemerkt werden, daß alle Gewebe die Fähigkeit besitzen, Bernsteinsäure zu oxydieren.

Den dritten Typus der Oxydationsprozesse bildet die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale dieses Prozesses sind folgende. Die Substanz oder die Substanzen, die die Oxydation dieser Säuren bewirken, sind in Wasser unlöslich und werden durch Alkohol- und Acetonbehandlung vernichtet. Das Temperaturoptimum liegt ungefähr bei 40°. Die Oxydationsenergie nimmt nach dem Tode des Tieres schnell ab und wird durch wiederholtes Waschen der Gewebe mit Wasser vernichtet.

Die Haupteigenschaften dieser drei Typen von Oxydationsprozessen können durch folgendes Schema wiedergegeben werden.

	Löslichkeit in Wasser	Wirksamkeit des Alkoholniederschlages	Temperaturoptimum	Fortdauer nach dem Tode	Widerstand gegen Auswaschen mit Wasser
I. Typus (Oxydationsfermente: Alkoholoxydase, Urikooxydase u. a.)	löslich	wirksam	55°	stabil	—
II. Typus (Oxydation der Bernsteinsäure)	unlöslich	unwirksam	40°	stabil	sehr resistent
III. Typus (Verbrennung der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure)	unlöslich	unwirksam	40°	labil	sehr labil

Die Natur des die Hauptatmung bewirkenden Prozesses ist uns bisher unbekannt, und wir enthalten uns Hypothesen aufzustellen, die noch keine experimentelle Begründung haben. Wir wollen bloß bemerken, daß kein Grund vorliegt, die Haupt-

atmung sowie die Verbrennung der Citronensäure Enzymwirkungen zuzuschreiben. In der Tat ist es bis jetzt noch nicht gelungen, die Hauptatmung in Abwesenheit von Zellen oder Zelltrümmern zu erzielen, und es ist möglich, daß die physikalische Struktur der Zelle für das Zustandekommen der Hauptatmung unumgänglich notwendig sei.

XIX. Experimentelle Ergebnisse.

1. Zusatz von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu den Geweben der höheren Tiere steigert recht energisch den Gasaustausch derselben, wenn die Versuchsbedingungen günstig sind.

2. Der respiratorische Quotient der durch den Zusatz von Fumar- und Apfelsäure bewirkten Steigerung des Gasaustausches beträgt ungefähr 1,33, gleichgültig um welches Gewebe es sich handelt (Muskel, Leber, Niere).

3. Der respiratorische Quotient der durch Citronensäurezusatz bewirkten Steigerung des Gasaustausches beträgt für den Muskel gewöhnlich 1,33 oder ist bisweilen etwas höher. Dieser Quotient ist hingegen recht hoch, wenn Leber oder Niere zur Verwendung kommen, weil diese Gewebe gleichzeitig die Fähigkeit haben, Citronensäure unter Kohlensäurebildung in Sauerstoffabwesenheit zu zersetzen.

4. Der respiratorische Quotient 1,33 entspricht der vollständigen Verbrennung der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu Wasser und Kohlensäure. Man muß folglich annehmen, daß diese Säuren durch die isolierten Tiergewebe in analoger Weise verbrannt werden wie im lebenden Organismus.

5. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wird die Citronensäure am schnellsten verbrannt; in zweiter Linie folgt die Fumarsäure und zuletzt die Apfelsäure.

6. Im allgemeinen oxydieren die Gewebe, die in vitro die stärkste Hauptatmung aufweisen, auch am energischsten die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Folglich sind es die roten Muskeln, die Leber und die Niere, die unter günstigen Versuchsbedingungen am stärksten die genannten Säuren oxydieren.

7. In dem Maße, wie die Hauptatmung in einem gegebenen Gewebe nach dem Tode abnimmt, verringert sich auch die

Fähigkeit des Gewebes, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Die Labilität dieses Oxydationsprozesses ist je nach den Geweben der verschiedenen Tiere sehr verschieden.

Die Gewebe, die keine Hauptatmung mehr besitzen, haben auch nicht die Fähigkeit, die eben genannten Säuren zu oxydieren.

8. Die die Oxydation dieser Säuren bewirkenden Körper können nicht durch Wasser extrahiert werden. Mehrfach wiederholtes Auswaschen der Gewebe vernichtet ihre Fähigkeit, diese Säuren zu oxydieren.

9. Durch Alkohol- oder Acetonbehandlung wird die oxydierende Wirkung der Gewebe gegenüber Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufgehoben.

10. Die Oxydation dieser Säuren vollzieht sich mit gleicher Energie in neutralem oder leicht alkalischem oder auch schwach saurem Medium. Mit steigender Alkalinität des Mediums nimmt die eigentliche Hauptatmung des Gewebes bedeutend zu, während die Oxydation dieser Säuren abnimmt.

Mit steigender Acidität des Mediums nimmt die eigentliche Atmung des Gewebes viel schneller ab als die Oxydation dieser organischen Säuren.

Zusatz von Natriumphosphat hat eine ähnliche Wirkung wie die Alkalinität.

11. Das Temperaturoptimum ist ungefähr bei 40°.

12. Die Oxydationsgeschwindigkeit der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure nimmt bis zu einer gewissen Grenze mit der Konzentration derselben zu.

13. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist in reinem Sauerstoff größer als in gewöhnlicher Luft.

14. Die Oxydationsintensität nimmt im Laufe des Versuches sehr schnell ab.

15. Zusatz von Blut zu den Geweben hat auf die Oxydation der Citronensäure je nach dem Frischezustand der Gewebe eine verschiedene Wirkung.

16. Zusatz von sehr kleinen Mengen Chlornatrium zu den Geweben steigert etwas die Oxydation der früher genannten Säuren. In mittlerer Konzentration steigert Chlornatrium die eigentliche Hauptatmung des Gewebes, während es die Oxydation dieser Säuren stark herabsetzt.

17. Zusatz von Fluornatrium in mittlerer Konzentration bewirkt keine Verminderung, bisweilen sogar eine Steigerung der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure, während die eigentliche Hauptatmung des Gewebes dadurch stark herabgesetzt wird.

18. Die Blausäure, der Salicyl- und Formaldehyd, die arsenige Säure und die Galle verringern oder vernichten bereits in geringer Konzentration die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

19. Man kann annehmen, daß der die Oxydation dieser Säuren bewirkende Prozeß mit dem der Hauptatmung der Gewebe identisch sei. Aber je nach den Versuchsbedingungen würden vorzugsweise die in den Geweben selbst enthaltenen Substanzen oder die hinzugesetzten organischen Säuren verbrannt werden.

Das Pnein ist nicht als ein Gemisch von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufzufassen.

Über die Dualität der Chlorophyllane.

Von

M. Tswett.

(Eingegangen am 28. Februar 1911.)

Über diese wichtige Frage erschien im vorigen Jahre an dieser Stelle ein Aufsatz des Herrn Marchlewski[1]), der mich zu folgenden sachlichen Erörterungen nötigt.

Gegen Willstätter, der sein Phäophytin als eine einheitliche Substanz betrachtet, hebt Marchlewski hervor, „er habe früher gezeigt, daß Chlorophyllan (Phäophytin) insofern nicht einheitlich ist, als es in vielen Fällen als Gemisch zweier Chlorophyllane anzusehen ist". Nun will ich nicht bestreiten, daß Marchlewski und Malarski neuerdings (1909) Versuche ausgeführt haben, die in vollem Einklang mit der von mir (1907 und 1908) bewiesenen Dualität der Chlorophyllane

[1]) Diese Zeitschr. 27, 248, 1910.

stehen, da sie sich durch dieselbe am einfachsten erklären; diese Versuche besitzen aber an und für sich keine beweisende Kraft, und ich muß mich daher wundern, daß Marchlewski nicht die Untersuchungen des Forschers erwähnt, dem die genannte Erkenntnis zu verdanken ist. Um nämlich den wirklichen Beweis zu führen, daß Chlorophyllan oder Phäophytin keine einheitliche Substanzen, sondern Gemische darstellen, war nur ein Weg offen: die Trennung der Komponenten mittels physikalischer Methoden. Diesen Weg habe ich an der Hand meiner adsorptionsanalytischen Methode eingeschlagen und konnte zeigen, daß im Chlorophyllan[1]) (oder Phäophytin[2]) Gemische zweier Chlorophyllinenderivate vorliegen, die ich spektroskopisch und chemisch charakterisierte und als Chlorophyllane α und β bezeichnete.

Wenn dagegen Marchlewski und Malarski bei ihren Versuchen,[3]) das Chlorophyllan oder Phäophytin durch langdauernde, unter Erwärmung verlaufende Einwirkung von Zinkhydroxyd und Kohlensäure in „Zinkchlorophylle" verwandeln, in demselben zwei ungleich schnell reagierende Fraktionen konstatieren, so ließe sich dies Resultat ebenso gut durch eine chemische Spaltung eines einheitlichen Chlorophyllans in zwei ungleich stark weiter reagierende Bestandteile erklären. In derselben Weise glaubte ja früher Marchlewski endgültig bewiesen zu haben,[4]) daß „Chlorophyll" (Chlorophyllin α) sich unter Säureeinwirkung in Phyllocyanin und Phylloxanthin spaltet, bevor ich zeigte,[5]) daß diese Produkte autonome Derivate der genuinen Chlorophylline α und β sind; wobei die Farbstoffkomponente des Phylloxanthins (eines Gemisches) wahrscheinlich mit Chlorophyllan β identisch ist, während Phyllocyanin ein (unter wirklicher Auflösung in Salzsäure) noch tiefer zersetzter Abkömmling des Chlorophyllins α ist.

Zum Schluß muß ich betonen, daß Chlorophyllan (= Phäophytin), aus grünen Samenpflanzen, Archegoniaten oder Chlorophyceen dargestellt, höchstwahrscheinlich in allen Fällen zwiefach sein muß. Meine an zahlreichen Pflanzenspezies ausgeführten chromatographischen Chlorophyllanalysen haben nämlich immer das Vorhandensein der beiden Chlorophylline (α und β) festgestellt, welche die Mutterfarbstoffe der Chlorophyllane α und β sind.

[1]) Diese Zeitschr. 5, 9, 1907.
[2]) Diese Zeitschr. 10, 404, 1908.
[3]) Diese Zeitschr. 21, 531, 1909 und Bull. Acad. Cracovie, 2, 537, 1909.
[4]) Diese Zeitschr. 3, 302, 1907.
[5]) Diese Zeitschr. 5, 18, 1907; 6, 373, 1907; 10, 428, 1908.

Autorenverzeichnis.

Bach, A. Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. I. S. 443.

Bang, Ivar und E. Overton. Studien über die Wirkungen des Kobragiftes. S. 243.

Battelli, F. und L. Stern. Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe. S. 478.

Baudrexel, August siehe Völtz und Baudrexel.

Bauer, J. und St. Engel. Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch. S. 46.

Braun, H. Beiträge zur Kenntnis des Komplementes. S. 65.

Döblin, A. siehe Rona und Döblin.

Engel, St. siehe Bauer und Engel.

Fürth, Otto von und Carl Schwarz. Über die Hemmung der Suprareninglucosurie und der sekretorischen Nierenleistung durch peritoneale Reize. S. 113.

Gröber, A. Über Veronal. S. 1.

Handovsky, Hans und Richard Wagner. Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithineiweißmischungen. S. 32.

Hildesheimer, A. siehe Neuberg und Hildesheimer.

Jürgensen, E. siehe Sörensen und Jürgensen.

Juschtschenko, A. J. Über den Nucleasegehalt verschiedener Organe des Menschen und der Tiere. S. 377.

Kawashima, K. Zur Kenntnis der Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren. S. 135.

Kochmann, Martin. Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde, nebst Bemerkungen über den Stoffumsatz der Phosphorsäure und der Magnesia. I. S. 361.

Loeb, Jacques (unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys). Die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze. S. 450.

— und Hardolph Wasteneys. Weitere Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Oxydationsgröße und Cytolyse der Seeigeleier. S. 168.

Löb, Walther. Bemerkungen zu der Arbeit von Stoklasa und Zdobnický: Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll. S. 358.

Loew, Oscar. Zur Theorie der Enzymwirkung. S. 159.

Löwenstein, Ernst und Ernst P. Pick. Studien über Antigenbildung in eiweißfreien Nährmedien. I. S. 142.

Lyttkens, H. und J. Sandgren. Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Menschenblut. S. 153.

Magnus-Levy, A. Über die Resorption von Cholesterinestern. S. 169.

Michaelis, Leonor siehe Rona und Michaelis.

Neuberg, C. und A. Hildesheimer. Über zuckerfreie Hefegärungen. I. S. 170.

Ohta, Kohshi. Über die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze nebst dem Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis. S. 177.

Pick, Ernst P. siehe Löwenstein und Pick.

Reinhardt, Richard und Ernst Seibold. Das Verhalten der Schardingerschen Reaktion gegenüber Colostralmilch von Kühen. S. 294.

— — Das Schardinger-Enzym in Milch von euterkranken Kühen. S. 385.

Rona, P. und A. Döblin. Untersuchungen über den Blutzucker. IX. S. 215.

— und Leonor Michaelis. Über Ester- und Fettspaltung im Blute und im Serum. S. 345.

— und D. Takahashi. Über das Verhalten des Calciums im Serum und über den Gehalt der Blutkörperchen an Calcium. S. 336.

Sandgren, J. siehe Lyttkens und Sandgren.

Schwarz, Carl siehe v. Fürth und Schwarz.

Seibold, E. siehe Reinhardt und Seibold.

Shibata, Nagamichi. Das Verhalten des Fettes tierischer Organe bei antiseptischer Aufbewahrung. S. 321.

Slowtzoff, B. Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern. S. 227.

— und L. W. Ssobolew. Über die chemischen Veränderungen in der Leber bei einigen pathologischen Prozessen. S. 234.

Sörensen, S. P. L. und E. Jürgensen. Über die Hitzekoagulation der Proteine. I. S. 397.

Ssobolew, L. W. siehe Slowtzoff und Ssobolew.

Stern, L. siehe Battelli und Stern.

Takahashi, D. siehe Rona und Takahashi.

Tswett, M. Über die Dualität der Chlorophyllane. S. 505.

Völtz, Wilhelm und August Baudrexel. Nachtrag zu der Arbeit: Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. S. 355.

Wagner, Richard siehe Handovsky und Wagner.

Wasteneys siehe Loeb und Wasteneys.

Yoshimura, Kiyohisa. Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime. S. 221.

Zaleski, W. Zum Studium der Atmungsenzyme der Pflanzen. S. 195.

PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO
IMMEDIATE RECALL

UCD LIBRARY

DUE DEC 1 1975

DEC 1 REC'D

Library, University of California, Davis

Series 458A

61881
Biochemische zeitschrift.
QP501
B54
v.30-31
JAN 2 '51
FEB 10 '51
MAR 15 '51

Biochemische zeitschrift
QP501
B54
v.30-31

PERIODICAL
61881

PAGE NOT AVAILABLE

PAGE NOT AVAILABLE